

Speziierung und Toxizität metall(oid)organischer
Verbindungen ausgewählter Metall(oid)e in
biologischen und umweltrelevanten Systemen

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES EINES

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

– DR. RER. NAT. –

VORGELEGT VON

JÖRG HIPPLER

GEBOREN AM 04.12.1968

IN RECKLINGHAUSEN

INSTITUT FÜR UMWELTANALYTIK

FAKULTÄT CHEMIE DER UNIVERSITÄT DUISBURG-ESSEN

CAMPUS ESSEN

2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2011 bis Februar 2013 im Arbeitskreis von Prof. Dr. A.V. Hirner am Institut für Umweltanalytik der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 13.09.2013

Gutachter: Prof. Dr. A.V. Hirner

Prof. Dr. E. Dopp

Prof. Dr. U. Karst

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Schulz

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	xv
Abkürzungsverzeichnis	xix
Einleitung	1
Allgemeiner Teil	7
1. Metall(oid)organische Verbindungen und Spezies	9
2. Metall(oid)organische Verbindungen in der Umwelt	13
2.1 Arsen und methylierte Verbindungen	17
2.2 Antimon und methylierte Verbindungen	23
2.3 Bismut und methylierte Verbindungen	25
2.4 Zinn und methylierte Verbindungen	30
2.5 Quecksilber und methylierte Verbindungen	31
3. Analytik metall(oid)organischer Verbindungen	36
3.1 Gesamtquecksilber-Analysator	38
3.2 Induktiv gekoppeltes Plasma Massenspektrometer (ICP-MS)	40
3.3 Chromatographie	44
4. Toxikologische Aspekte	50
4.1 Metalle im menschlichen Körper	50
4.2 Toxizität metall(oid)organischer Verbindungen	53

Spezieller Teil	61
1. Metallorganische Verbindungen in Biogasanlagen	63
1.1 Biogasanlagen	64
1.2 Probennahme, Probenbeschreibung, Probenlagerung	67
1.3 Methoden	71
1.3.1 Bestimmung des Gesamtquecksilbers	71
1.3.2 Speziesbestimmung im Biogas (As, Sb, Hg Spezies)	71
1.3.3 Speziesbestimmung im Anmaischbecken, Nachgärer und Kondensat (Hydridgenerierung)	73
1.3.4 Arsenspeziesbestimmung im Anmaischbecken, Nachgärer und Kondensat (HPLC)	74
1.4 Ergebnisse und Diskussion	76
1.4.1 Speziesbestimmung im Biogas (As, Sb, Hg Spezies)	76
1.4.1.1 Arsenspezies	77
1.4.1.2 Antimonspezies	80
1.4.1.3 Quecksilberspezies	82
1.4.1.4 Zinnspezies	84
1.4.1.5 Zusammenfassung Biogas	86
1.4.2 Gesamtquecksilbergehalte im Anmaischbecken, Nachgärer und Kondensat	88
1.4.3 Speziesbestimmung (As, Sb, Hg) in Anmaischbecken, Nachgärern und Kondensaten von Biogasanlagen (Hydridgenerierung)	91
1.4.3.1 Anmaischbecken - Speziesbestimmung (As, Sb, Hg / Hydridgenerierung)	92
1.4.3.2 Nachgärer - Speziesbestimmung (As, Sb, Hg / Hydridgenerierung)	98
1.4.3.3 Kondensat - Speziesbestimmung (As, Sb, Hg / Hydridgenerierung)	104
1.4.4 Arsen-Speziesbestimmung in Anmaischbecken, Nachgärern und Kondensaten der Biogasanlagen mittels HPLC – ICP-MS	109
1.4.4.1 Anmaischbecken	110

1.4.4.2	Nachgärer	111
1.4.4.3	Kondenswasserproben	113
1.5	Zusammenfassung und Diskussion zu den Biogasanlagen	116
2.	Speziesbestimmung in Deponiewässern	122
2.1	Probennahme	123
2.2	Methoden und Geräte	125
2.2.1	Gesamtmetallgehalte	125
2.2.2	Speziierung (Arsen)	125
2.3	Ergebnisse und Diskussion	126
2.3.1	Gesamtmetallgehalte	126
2.3.2	Speziesbestimmung im Deponiewasser	128
2.3.2.1	Retentionszeitabhängigkeit der Arsenspezies vom Chloridgehalt	128
2.3.2.2	Arsenspezies in Deponiewässern	131
2.4	Zusammenfassung und Ausblick	135
3.	Permeation metall(oid)organischer Verbindungen durch Arbeitsschutzmaterialien	137
3.1	Einleitung	137
3.2	Permeationszelle	142
3.3	Chemikalien und metall(oid)organische Standards	144
3.4	Instrumente / Detektor	145
3.5	Experimenteller Teil	147
3.5.1	Proben / Handschuhmaterialien	147
3.5.2	Totzeit	147
3.5.3	Nachweisgrenzen und Kalibration	148
3.5.4	Permeationsversuche / Permeationszeiten	149
3.6	Ergebnisse und Diskussion	151

3.6.1	Totzeiten	151
3.6.2	Nachweisgrenzen und Kalibration	151
3.6.3	Durchbruchzeiten / Permeationszeiten	153
3.6.4	Permeationsraten	159
3.7	Zusammenfassung	161
4.	Toxikologische Untersuchungen	163
4.1	Zytotoxizität leichtflüchtiger metall(oid)organischer Verbindungen	163
4.1.1	Einleitung	163
4.1.2	Material und Methoden	164
4.1.2.1	Zellkultur	164
4.1.2.2	Reagenzien	166
4.1.2.3	Expositionsgefäß / Exposition	169
4.1.2.4	Trypanblau-Test	171
4.1.3	Ergebnisse und Diskussion	172
4.1.4	Zusammenfassung	179
4.2	Wirkung von Monomethylarsen auf HepG2 und UROtsa	182
4.2.1	Material und Methoden	183
4.2.2	Ergebnisse und Diskussion	192
4.2.3	Zusammenfassung: Arsenzyklus in HepG2 und UROtsa – Zellen	201
4.3	Anmerkungen zu den verwendeten UROtsa – Zellen	204
	Zusammenfassung	207
	Literaturverzeichnis	213
	Danksagung	I
	Erklärung	III
	Lebenslauf	V
	Publikationsliste	VII

Anhang - Arsenspezies im Bier	XI
Anhang - Poster	XIII
Anhang - Sonderdrucke eigener Publikationen	XV

Abbildungsverzeichnis¹

Abbildung 1: Louis-Claude Cadet de Gassicourt. Er synthetisierte 1757 die erste arsenorganische Verbindung.....	9
Abbildung 2: Mechanismus der Biomethylierung nach Challenger.....	14
Abbildung 3: Metall(oid)speziesverteilung an kontaminierten Standorten. (a) Metall(oid)organische Speziesverteilung in Abhängigkeit der Metall(oid)konzentration und der biologischen Aktivität sowie (b) ringförmiger Bereich methylierter Spezies um eine Metall(oid) Hot-Spot Kontamination.	16
Abbildung 4: Realgar (As_4S_4 , auch Rauschrot) wird in Ablagerungen von heißen Quellen oder als vulkanisches Sublimationsprodukt gefunden. Die Schönheit von Realgar ist vergänglich: Es ist ein nicht stabiles Mineral und zerfällt langsam zum Auripigment (As_2S_3).	17
Abbildung 5: Weltweiter Überblick über Gebiete mit bekannter, dokumentierter Arsenproblematik im Grundwasser sowie Arsenkontaminationen durch Bergbau bzw. geothermale Quellen.....	21
Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der Bildung von methylierten Bismutspezies im Humanblut nach Einnahme eines Bismutcitrat enthaltenden Medikamentes. Retentionszeiten der Bi-Spezies nach Ethylierung: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$, 2,7 Min.; $(\text{CH}_3)_2\text{Bi}^+$, 4,9 Min.; $(\text{CH}_3)\text{Bi}^{2+}$, 7,3 Min. und Bi^{3+} , 8,8 Min.....	28
Abbildung 7: Verteilung der globalen Quecksilberemissionen (Stand 2005).....	31
Abbildung 8: Globaler Quecksilberkreislauf.....	32
Abbildung 9: Quecksilber-Methylierungsrate (Mercury methylation rate, MMR) als Funktion der Sulfatverfügbarkeit.	34
Abbildung 10: Analytischer Nachweis von Arsen aus dem Jahre 1837 (links, Marsh'sche Probe) und Arsenspeziesbestimmung heute mittels HPLC/ICP-MS (rechts).....	36

¹ Einige Abbildungen wurden englischsprachiger Originalliteratur entnommen. Auf eine Übersetzung der Beschriftungen wurde in diesen Fällen verzichtet.

Abbildung 11: Schematischer Überblick über die Kopplungsmöglichkeiten verschiedener analytischer Systeme zur Speziesanalytik	38
Abbildung 12: Schematische Darstellung des „Direct Mercury Analyzers“ (DMA-80). Bildquelle: Milestone S.r.l., Sorisole, Italy.	39
Abbildung 13: Schematischer Aufbau eines induktiv gekoppelten Plasma Massenspektrometers (ICP-MS; Agilent 7500a). Bildquelle: Agilent Technologies, Waldbronn, Germany.	40
Abbildung 14: Aufbau und Gasflüsse der Plasmafackel mit Induktionsspule und Interface (Thomas, 2001 b).	41
Abbildung 15: Parallele Kopplung von ICP-MS und EI-MS nach gaschromatographischer Trennung	47
Abbildung 16: „Molecular Mimikry“ in Form von Methionin und Methyl-Hg-Cystein.	51
Abbildung 17: Struktureller Vergleich zwischen dem physiologischen Phosphat- (a) und dem toxischen Arsenat- Oxoanion (b). Diese toxischen Ionen können als Substrate im Sinne des molekularen Mimikry in das Zellinnere transportiert werden.	52
Abbildung 18: Übersicht zur Verteilung von Arsen im Körper sowie der Biomethylierung in der Leber. Nach Speicherung und Methylierung in der Leber wird Arsen nur langsam über den Urin wieder eliminiert.	57
Abbildung 19: Vorgeschlagener Pfad zur Bildung von MMMTA(V) und DMMTA(V) in Lysaten aus HepG2 Zellen nach Exposition der Zellen gegen MMA(III). Das an die unbekannte Verbindung U1 gebundene MMA(III) kann auf unterschiedlichen Wegen abgebaut werden. Möglich ist zum Einen eine direkte Oxidation zu MMA(V), welches durch Sekretion später im Urin nachgewiesen werden kann (Weg 1). Zum Anderen besteht die Möglichkeit des Abbaus entweder über DMA(V) (Weg 3,4,5,6) oder direkt über die Thiospezies unter Bildung des MMMTA(V) (Weg 7,8,9). Endprodukt ist bei beiden Wegen das von Suzuki et al. beschriebene DMMTA(V).	59
Abbildung 20: Technische Skizze einer Biogasanlage (Bildquelle: Webseite der "Agentur für Erneuerbare Energien")	64
Abbildung 21: Probennahmestellen an den Biogasanlagen (Bildquelle: Webseite der "Agentur für Erneuerbare Energien")	69

Abbildung 22: Repräsentative Proben aus den beprobten Biogasanlagen: a) Anmaischbecken, b) Nachgärer, c) Kondenswasser.....	70
Abbildung 23: Chromatogramme zur Bestimmung der Retentionszeiten von Me ₂ Hg (links) und Me ₃ As (rechts) mittels ICP-MS.....	77
Abbildung 24: Chromatogramme der Arsen - Speziesanalyse im Biogas der Anlagen A bis D.....	79
Abbildung 25: Chromatogramme der Antimon - Speziesanalyse im Biogas der Anlagen A bis D.....	81
Abbildung 26: Chromatogramme der Quecksilber - Speziesanalyse im Biogas der Anlagen A bis D.....	83
Abbildung 27: Chromatogramme der Zinn - Speziesanalyse im Biogas der Anlagen A bis D.....	85
Abbildung 28: Gesamtquecksilbergehalte (µg/kg) in Anmaischbecken, Nachgärern und Gaskondensaten aus den Biogasanlagen A bis D.....	89
Abbildung 29: Typisches Chromatogramm (GC-ICP-MS; m/z=75) eines Arsenstandards mit iAs(III), iAs(V), MeAs(III), MeAs(V), Me ₂ As(III) nach Derivatisierung (Hydrierung). Die fünfwertigen As-Verbindungen wurden zum dreiwertigen Hydrid reduziert.	92
Abbildung 30: Arsen - Speziesanalyse in Anmaischbecken A – D nach Derivatisierung.....	93
Abbildung 31: Massenspuren von ⁷⁵ As und ³⁴ S in einer Messung des Anmaischbeckens (Anlage A) nach Derivatisierung. Eine Korrelation zwischen den As und S – Spuren ist nicht zu erkennen.....	95
Abbildung 32: Antimon - Speziesanalyse in Anmaischbecken A – D nach Derivatisierung.....	96
Abbildung 33: Quecksilber - Speziesanalyse in Anmaischbecken A – D nach Derivatisierung.....	97
Abbildung 34: Arsen - Speziesanalyse in Nachgärern A – D nach Derivatisierung	99
Abbildung 35: Antimon - Speziesanalyse in Nachgärern A – D nach Derivatisierung.....	101

Abbildung 36: Quecksilber - Speziesanalyse in Nachgärern A – D nach Derivatisierung	102
Abbildung 37: Arsen - Speziesanalyse in Kondensaten A – D nach Derivatisierung	104
Abbildung 38: Antimon - Speziesanalyse in Kondensaten A – D nach Derivatisierung	106
Abbildung 39: Quecksilber - Speziesanalyse in Kondensaten A – D nach Derivatisierung	107
Abbildung 40: Chromatogramm verschiedener Arsen-Spezies (As(III), MMA(III), DMA(V), MMA(V), As(V)) nach HPLC-Trennung (Standard).....	109
Abbildung 41: Chromatogramm der Arsen-Speziesbestimmung (HPLC-ICP-MS) im Filtrat des Anmaischbeckens der Biogasanlage A. Neben den Spezies As(III) und DMA(V) konnten zwei weitere, unbekannte Arsenspezies (?) mit einer Retentionszeit von 435 und 867 Sek. nachgewiesen werden.....	110
Abbildung 42: Chromatogramm der Arsen-Speziesbestimmung (HPLC-ICP-MS) im Filtrat des Nachgärers der Biogasanlage A.	112
Abbildung 43: Chromatogramm der Arsen-Speziesbestimmung (HPLC-ICP-MS) im Filtrat des Kondenswassers der Biogasanlage B (? = unbekannte Arsenspezies)	114
Abbildung 44: Probennahmestelle für Biogas an Biogasanlage A (beste Probennahmebedingungen aller Anlagen).....	116
Abbildung 45: Vergleich der Emissionen permethylierter, metall(oid)organischer Verbindungen aus natürlichen Gasen (Natural Gas), Deponiegas (Landfill Gas), Klärgas (Sewage Gas) und Gaskondensaten (Gas Condensate) im Vergleich mit Biogasanlagen. Vergleichswerte und Abbildung entnommen aus: Rettenmeier <i>et al.</i> (in Vorbereitung).	118
Abbildung 46: Anmaischbecken einer Biogasanlage (Öffnung)	119
Abbildung 47: Speziesverteilung von Arsen im Kompost über einen Zeitraum von 0 bis 60 Tagen.....	120
Abbildung 48: As-Spezies im Deponiewasser aus dem Bereich „M“ (Probe 2671, Teilprobe 3) bei vorhandener Argon-Chlorid Interferenz.....	129

Abbildung 49: Retentionszeitverschiebung von As(V) bei hohen NaCl-Konzentrationen. Oben: Chromatogramm eines As-Multi-Standards (20 pg As je Spezies) mit einer NaCl-Konzentration von 5 g/l. Unten: Chromatogramm ohne NaCl-Zusatz.....	130
Abbildung 50: Retentionszeitverschiebung von As(V) bei erhöhter NaCl – Konzentration im Bereich von 0 bis 20 g/l.....	131
Abbildung 51: Chromatogramm der Probe 2668 (Bereich „M“). Auffallend ist das Auftreten einer unbekannten Arsen-Spezies mit einer Retentionszeit von 451s.	133
Abbildung 52: Graphische Übersicht der Arsenspezies (µg/L) in Deponiewässern im Bereich „M“.....	135
Abbildung 53: Geschlossene (I) und offene Permeationszelle (II). Die Handschuhproben werden zwischen den oberen und unteren Schliff der Zelle so platziert, dass sich die Heizspirale direkt unterhalb des Probenstückes befindet. Abbildung I: Septum zur Injektion der Probensubstanz (A); B und C: Headspace Ventile. Abbildung II: Anschlüsse für Heizflüssigkeit (A und B) sowie für Probengas Ein- (D) und Auslass (C).	142
Abbildung 54: Glove-Box mit Permeationszelle, angeschlossen an ein ICP-MS.	144
Abbildung 55: Berechnung des Signal/Rausch-Verhältnisses: $S/N = \frac{\text{Signal}}{\text{Rausch-Verhältnis}}$, H = Höhe des gemessenen Peaks (Basislinie bis Peakspitze) und h_n = größte Schwankung der Basislinie im Bereich von 5–20 Halbwertsbreiten (wh) gemessen am Chromatogramm einer Blindprobe.	149
Abbildung 56: Kalibrationsgeraden, für Me_3GeCl (oben) und Me_4Sn (unten) zur Quantifizierung der Permeationsraten mit Bestimmtheitsmaß (R^2).....	152
Abbildung 57: Durchbruchzeit von Me_2Hg für einen Latex-Einmalhandschuh nach Aufgabe von 10 µl einer 1 g/l Lösung auf die Handschuhoberfläche. Die Durchbruchzeit beträgt etwa 11 Sekunden (14 Sekunden abzüglich der Totzeit von 3 Sekunden).....	153
Abbildung 58: Durchbruchzeiten von Me_2Hg durch Latex, Nitril und SilverShield (Norfoil®) bzw. Ansell (Barrier®) Handschuhmaterialien nach Aufgabe von 10 µl eines 1 g/l Standards. Die Signale am Ende einer jeden Messung (175 / 1140 Sekunden) entstehen durch das Abkoppeln der Messzelle vom Detektor.	155

Abbildung 59: Permeation von Me_3Bi (30 Sekunden), Me_2AsI (40 Sekunden), Me_4Sn (50 Sekunden) und Me_3GeCl (75 Sekunden) durch Latexhandschuhe nach Aufgabe von 10 μl eines 1 g/l Standards.....	156
Abbildung 60: Permeation von Me_2Hg (10 Sekunden), Me_4Sn (35 Sekunden), Me_3GeCl (45 Sekunden), Me_2AsI (45 Sekunden) und Me_3Bi (45 Sekunden) durch Vinylhandschuhe nach Aufgabe von 10 μl eines 1 g/l Standards.....	157
Abbildung 61: Permeation von Me_2Hg (10 Sekunden), Me_4Sn (35 Sekunden), Me_3GeCl (45 Sekunden), Me_2AsI (45 Sekunden) und Me_3Bi (45 Sekunden) durch Nitrilhandschuhe nach Aufgabe von 10 μl eines 1 g/l Standards.....	158
Abbildung 62: GC/MS – Analyse mit Chromatogramm und Massenspektrum des synthetisierten DMA(III) nach mehrfacher, fraktionierter Destillation (gelbe, ölige Flüssigkeit, Siedepunkt 155 °C). Retentionszeit: 6,41 Minuten.	168
Abbildung 63: Zellkultur-Einsatz (ThinCert) auf Halter / Ständer (links). Expositionsgefäß mit Einsatz / Halterung für ThinCert (rechts).	169
Abbildung 64: Modifizierter Glasbehälter zur Exposition der Zellen gegen leicht flüchtige metall(oid)organische Spezies. Die Zellen wachsen dazu auf permeablen Membranen (ThinCerts®).	170
Abbildung 65: Dreifachbestimmung der Vitalität von HepG2-Zellen mittels Trypanblau nach Exposition der Zellen gegen verschiedene Injektionsvolumina Me_3As	172
Abbildung 66: Zellvitalität bei Exposition gegen Me_3As im Vergleich zur Exposition bei abgedeckter Membran.....	173
Abbildung 67: Vergleich der Zytotoxizität der fünf verschiedenen Metall(oid)verbindungen (Me_3Bi , Me_4Sn , Me_3As , Me_2AsI , Me_2Hg) in CHO-9-Zellen (Zweifachbestimmung).	174
Abbildung 68: Zytotoxizität von Dimethylarseniodid (Me_2AsI) in CHO-9, HepG2 und CaCo-Zellen (Dreifachbestimmung).	175
Abbildung 69: Zytotoxizität von Trimethylarsin (Me_3As) in CHO-9, HepG2 und CaCo Zellen (Dreifachbestimmung).	176
Abbildung 70: Zytotoxizität von Trimethylbismut (Me_3Bi) in CHO-9, HepG2 und CaCo Zellen (Dreifachbestimmung).	177

Abbildung 71: Zytotoxizität von Tetramethylzinn (Me_4Zn) in CHO-9, HepG2 und CaCo Zellen (Dreifachbestimmung).....	178
Abbildung 72: Waschschritte zur Entfernung der extrazellulären Arsenspezies.	187
Abbildung 73: Typisches Chromatogramm eines Arsen-Multistandards (50 pg As), Säule: Luna®; 3 μ	190
Abbildung 74: Chromatogramm eines Arsen-Multistandards, zusätzlich mit Monothioarsenat (MTA(V)) und Arsenobetain (As-Bet) versetzt; gemessen auf einer C-18 Säule (Luna(R); 3 μ).	192
Abbildung 75: Strukturformel des Tetrabutylammoniumhydroxids (TBAH) ...	193
Abbildung 76: Chromatogramm eines Arsen-Multistandards, (incl. Monothioarsenat (MTA(V)) und Arsenobetain (As-Bet)) bei Verwendung von Weinsäure an Stelle von Malonsäure im Laufmittel (Säule: C-18 Säule (Luna(R); 3 μ)).	194
Abbildung 77: HPLC/ICP-MS Speziesanalyse des Zellrückstandes von HepG2-Zellen nach 24 stündiger Exposition gegen MMA(III) und anschließendem Verdau.....	196
Abbildung 78: Zeitlicher Verlauf der Speziesverteilung im Zellpellet nach Exposition von HepG2-Zellen gegen MMA(III) (5 $\mu\text{mol/l}$) und anschließendem Verdau mittels Proteinase K.	197
Abbildung 79: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Speziesverteilung nach Inkubation von HepG2-Zellen gegen MMA(III) (5 $\mu\text{mol/l}$).	199
Abbildung 80: Quantifizierung des Gesamtarsengehaltes in den Lysaten von HepG2 und UROtsa-Zellen im Vergleich zu den Arsenkonzentrationen in den jeweiligen nicht löslichen Fraktionen (Zellpellets).	200
Abbildung 81: Vorgeschlagener intrazellulärer Arsenzyklus in HepG2 (links) und UROtsa – Zellen (rechts) nach Exposition gegen MMA(III) (Zdrenka <i>et al.</i> , 2012)	203

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stabilität methylierter metall(oid)organischer Verbindungen gegen Sauerstoff	11
Tabelle 2: Auswahl einiger häufig vorkommender organischer Arsenspezies. Eine ausführliche Liste sowie die möglichen Reste (R) der Arsenozucker befinden sich im Anhang	20
Tabelle 3: Massen und relative Häufigkeit von natürlichen Zinnisotopen	30
Tabelle 4: Ausgewählte, polyatomare Interferenzen im ICP-MS	43
Tabelle 5: Metallbelastung des menschlichen Körpers. Zur Berechnung der Atome pro Zelle in Spalte 4 wurde eine idealisierte Verteilung auf alle 10^{14} Zellen angenommen.	50
Tabelle 6: Überblick über LD ₅₀ -Werte für verschiedene Arsenverbindungen.	53
Tabelle 7: Zusammensetzung von Biogas	65
Tabelle 8: Übersicht über untersuchte Hotspots metall(oid)organischer Verbindungen am Institut für Umweltanalytik	66
Tabelle 9: An den Biogasanlagen entnommene Proben	67
Tabelle 10: Geräteparameter GC / ICP-MS zur Speziesbestimmung im Biogas ...	72
Tabelle 11: Laufmittelzusammensetzung zur Arsen-Speziesbestimmung mittels Flüssigkeitschromatographie.....	74
Tabelle 12: ICP-MS Parameter zur Quantifizierung verschiedener Arsenspezies nach externer Kalibration. RF-Energie, Torch-Position und Gasflüsse wurden täglich mit Hilfe der Tunig-Routine optimiert.	75
Tabelle 13: Konzentration der quantifizierten Arsenspezies im Biogas der Anlagen A bis D.	78
Tabelle 14: Übersicht über die Konzentration nachgewiesener leicht flüchtiger Metall(oid)spezies im Biogas der Anlage B.	86

Tabelle 15: Gesamt Hg-Gehalte in den Anmaischbecken, Nachgärern und Gas-Kondensaten der Biogasanlagen A bis D	88
Tabelle 16: Gesamt Hg-Gehalte verschiedener in der Biogasproduktion eingesetzter Substrate, bezogen auf die Trockensubstanz.	90
Tabelle 17: Quantifizierte As-Spezies im Anmaischbecken der Biogasanlagen A bis D	94
Tabelle 18: Quantifizierte Hg-Spezies im Anmaischbecken der Biogasanlagen A bis D	98
Tabelle 19: Quantifizierte As-Spezies im Nachgärer der Biogasanlagen A bis D	100
Tabelle 20: Quantifizierte Hg-Spezies im Nachgärer der Biogasanlagen A bis D	103
Tabelle 21: Quantifizierte As-Spezies in den Kondensaten der Biogasanlagen A bis D	105
Tabelle 22: Quantifizierte Hg-Spezies im Kondensat der Biogasanlagen A bis D	108
Tabelle 23: As-Spezies im Filtrat der Anmaischbecken der Anlagen A bis D	111
Tabelle 24: As-Spezies im Filtrat der Nachgärer der Anlagen A bis D.....	113
Tabelle 25: As-Spezies im Filtrat der Kondenswässer der Anlagen A bis D	114
Tabelle 26: Vergleich der mittels HPLC ermittelten Konzentrationen der Arsenspezies in den Kondenswässern der Anlagen A und B mit den Konzentrationen der gleichen Anlage, die mittels Hydridgenerierung ermittelt wurden.	115
Tabelle 27: Einzelprobenübersicht Deponiewässer Bereich „M“	124
Tabelle 28: Gesamtmetallgehalte (µg/kg) in Deponiewässern aus dem Bereich „L“ (ICP-MS Methode)	127
Tabelle 29: Gesamtmetallgehalte (µg/l) in Deponiewässern aus dem Bereich „M“ (ICP-MS-Methode sowie DMA 80 - Methode).....	127

Tabelle 30: As-Spezieskonzentrationen ($\mu\text{g/L}$) in Deponiewässern im Bereich „M“	132
Tabelle 31: As-Spezieskonzentrationen ($\mu\text{g/L}$) in Deponiewässern im Bereich „L“	133
Tabelle 32: Durchbruchzeiten von Dimethylquecksilber	138
Tabelle 33: Liste der Prüfchemikalien für Einmalhandschuhe.....	139
Tabelle 34: Schutzindex für Handschuhe nach EN 374-1:2003	141
Tabelle 35: ICP-MS Parameter (Agilent® 7500a)	145
Tabelle 36: Getestete Handschuhmaterialien	147
Tabelle 37: Nachweisgrenzen des ICP-MS beim Permeationstest	151
Tabelle 38: Zusammenfassung der Durchbruchzeiten verschiedener Handschuhtypen und metall(oid)organischen Verbindungen bei 35 °C.....	159
Tabelle 39: Übersicht der Permeationsraten durch verschiedene Einmalhandschuhe.....	160
Tabelle 40: Zusammensetzung der Nährmedien für CaCo, CHO bzw. HepG2-Zellen.....	165
Tabelle 41: Siedepunkte der auf Toxizität getesteten, leichtflüchtigen metall(oid)organischen Verbindungen.....	168
Tabelle 42: LC ₅₀ -Werte der untersuchten flüchtigen Metall(oid)spezies für unterschiedliche Zelllinien (Expositionszeit: 1 Stunde).....	178
Tabelle 43: Verwendete Arsenstandards mit Bezugsquellen.....	184
Tabelle 44: Zusammensetzung der Nährmedien für UROtsa-Zellen.....	185
Tabelle 45: Waschlösungen für UROtsa und HepG2-Zellen sowie weiterer Lösungen.	186
Tabelle 46: Laufmittelzusammensetzung zur Arsen-Speziesbestimmung mittels Flüssigkeitschromatographie.....	189

Tabelle 47: ICP-MS Parameter zur Quantifizierung verschiedener Arsenspezies nach externer Kalibration. RF-Energie, Torch-Position und Gasflüsse wurden täglich mit Hilfe der „Tuning-Routine“ optimiert.	190
---	-----

Abkürzungsverzeichnis

A

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
AEC	Anionenaustausch-Chromatographie
AFS	Atomfluoreszenzspektroskopie
As(III)	Arsenit
As(V)	Arsenat
As-Bet	Arsenobetain
ATP	Adenosintriphosphat

B

BG	Bestimmungsgrenze
----	-------------------

C

cps	Counts per second
CCA	Chromated Copper Arsenate
CHO	Chinese Hamster Ovary Ovarien des chinesischen Hamsters

D

D4	Octamethylcyclotetrasiloxan
D5	Decamethylcyclopentasiloxan
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMA 80	Direct Mercury Analyzer
DMA(III)	Dimethylarsen (III)
DMA(V)	Dimethylarsen (V)
DMDTA(V)	Dimethyldithioarsenat / Dimethyldithioarsinsäure
DMMTA(III)	Dimethylmonothioarsenit / Dimethylmonothioarsinige Säure
DMMTA(V)	Dimethylmonothioarsenat / Dimethylmonothioarsinsäure
DMPS	2,3-Dimercapto-1-propansulfonsäure

E

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation

G

GC	Gaschromatograph / Gaschromatographie
GSH	Glutathion
gv	Gasvolumen (gas volume)

H

HepG2	Hepatozyten (Human Hepatoma Cells)
HG	Hydridgenerierung

Abkürzungsverzeichnis

HPLC	High Performance Liquid Chromatography Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
------	--

I

iAs (III / V)	Anorganisches Arsen (inorganic) – siehe As(III) bzw. As(V)
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma)

K

k.A.	Keine Angabe
------	--------------

L

LC	Liquid-Chromatographie / Flüssigkeits-Chromatographie
LC ₅₀	Letale Konzentration (mittlere) / Lethal Concentration
LD ₅₀	Letale Dosis (mittlere)
lv	Flüssigkeitsvolumen (liquid volume)

M

m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
M-C	Metall(oid)-Kohlenstoff-Bindung
Me ₂ Hg	Dimethylquecksilber
Me ₃ As	Trimethylarsen
Me ₃ Bi	Trimethylbismut
Me ₄ Sn	Tetramethylzinn
MeHg	Monomethylquecksilber
MEM	Minimum Essential Medium
MMA(III)	Monomethylarsen (III)
MMA(V)	Monomethylarsen(V)
MMMTA(V)	Monomethylmonothioarsenat / Monomethylmonothio- arsonsäure
MMR	Quecksilber-Methylierungsrate / Mercury methylation rate
MS	Massenspektrometer
MTA(V)	Monothioarsenat(V)

N

n.n.	Nicht nachweisbar
NG	Nachweisgrenze

P

PBS (D-PBS)	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Polyethylen
PET	Polyethylenterephthalat

R

RP	Reversed-Phase / Umkehrphasen (-Chromatographie)
----	--

S

SAM	S-Adenosylmethionin
SEC	Size Exclusion Chromatography / Größenausschluss-Chromatographie
SRB	Sulfatreduzierende Bakterien
SRR	Sulfat-Reduzierungsrate
σ_B	Standardabweichung des Blindwertes

T

T	Temperatur
t_0	Totzeit
TeMA+	Tetramethylarsonium-Ion
TFA	Trifluoressigsäure
TMA(III)	Trimethylarsin
TeMA(V)	Tetramethylarsen
TMAO(V)	Trimethylarsenoxid
t_R	Retentionszeit

U

U1 bis U3	Unbekannte Arsen-Spezies 1 – 3
UPLC / UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography (Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
UROtsa	humane Urothelzelllinie / urothelial cells

W

WHO	Weltgesundheitsorganisation
-----	-----------------------------

X

\bar{x}_B	Mittelwert des Blindwertes
-------------	----------------------------

Einleitung

„Gosio“, „Wetterhahn“, „Minamata“, „Black Foot Disease“

Dies sind nur einige Synonyme, die für die Gefahren stehen, die von Metall(oid)en oder methylierten metall(oid)organischen Verbindungen ausgehen können. Zudem geben diese Begriffe zugleich zu bedenken, wie stark sich die Eigenschaften der anorganischen Formen von ihren methylierten, organischen Verbindungen unterscheiden können.

Diese Arbeit befasst sich daher mit der Speziierung und Toxizität metall(oid)organischer Verbindungen, insbesondere mit der des Arsens, aber auch mit Hg, Bi und Sn in biologischen und umweltrelevanten Systemen².

² Teile dieser Arbeit wurden bereits in internationalen Fachzeitschriften sowie als Buchkapitel, Poster und in Form von Vorträgen veröffentlicht.

Einleitung und Ziele dieser Arbeit

Spätestens seit dem Auftreten chronischer Arsenvergiftungen in Indien und Bangladesch („Black Foot Disease“), den Massenvergiftungen in der Bucht von Minamata (Japan) durch Einleiten von Methylquecksilber ins Meerwasser³ oder dem tragischen Unfall von Prof. K. Wetterhahn, welche bei der Herstellung eines NMR-Standards wenige Tropfen des Dimethylquecksilbers auf ihre Latexhandschuhe bekam und einige Monate später an den Folgen dieses Unfalls verstarb, ist die toxische Wirkung metall(oid)organischer Verbindungen und deren Einfluss auf die Umwelt bekannt.

Seither weiß man, dass gerade Latexhandschuhe von diesen Substanzen schnell durchdrungen werden. Allerdings sind bis heute kaum Daten über die Permeabilität anderer metall(oid)organischen Verbindungen wie z.B. Tetramethylzinn (Me_4Sn) oder Trimethylbismut (Me_3Bi) durch Einmalhandschuhe unter typischen Laborbedingungen verfügbar. Dies soll in einem Teil dieser Arbeit durch die Verwendung einer neuen Testzelle nachgeholt werden.

Auch an anderer Stelle werden Kunststofffolien verwendet, welche von metall(oid)organischen Verbindungen durchdrungen werden können. So werden z.B. Fermenter zur Biogaserzeugung, in denen metall(oid)organische Verbindungen gebildet werden könnten, mit Kunststoffplanen überdeckt. Inwieweit diese Verbindungen dort tatsächlich entstehen, ist bisher aber nicht bekannt und soll hier Beispielhaft an vier Biogasanlagen untersucht werden.

³ Bereits 1956 traten in Minamata die ersten Erkrankungen auf. Später (1968) wurden auch Fälle aus dem Becken des Agano Flusses bekannt. Bei der Krankheit handelt es sich um eine Vergiftung des zentralen Nervensystems durch Methylquecksilber. Dies gelangte über die Abwässer einer Chemiefabrik, welche Acetaldehyd nach dem Hoechst-Prozess herstellte, in die Umwelt. Bei diesem Prozess der nassen Oxidation wird Acetylen unter Verwendung von anorganischem Quecksilber als Katalysator mit Wasser zu Acetaldehyd (Ethanal) umgesetzt. Als Nebenprodukt dieser Reaktion entsteht pro Tonne Acetaldehyd etwa 1kg Methylquecksilber, welches über Jahrzehnte ins Meer geleitet wurde.

Die Fähigkeit der metall(oid)organischen Verbindungen, Barrieren wie etwa Folien, Membranen oder die Haut leicht zu durchdringen, kann man sich allerdings auch zu Nutze machen, um so die toxische Wirkung dieser leichtflüchtigen Verbindungen zu untersuchen. Dazu können Zellen auf eine Membran aufgebracht und so gegen flüchtige metall(oid)organische Verbindungen exponiert werden. Ein entsprechender Versuchsaufbau ist ebenfalls Teil dieser Arbeit.

Während die Toxizität der anorganischen Formen dieser Metall(oid)e meist sehr gut dokumentiert ist (Arsen bzw. Quecksilber) und einige von ihnen zudem relativ wenig giftig sind (z.B. Zinn oder Bismut), können deren methylierte, metall(oid)organischen Verbindungen hochtoxisch sein (siehe Dimethylquecksilber).

Für Arsen wird oft die unterschiedliche Aufnahme einzelner Spezies in die Zellen für deren toxikologische Wirkung verantwortlich gemacht und viele Studien beschreiben Monomethylarsen (MMA(III)) als wichtigen Metaboliten im humanen Arsenzyklus. Dennoch ist über die toxische Wirkung metall(oid)organischer Verbindungen auf menschliche Zellen bei Weitem nicht alles bekannt. Im Rahmen vorangegangener Arbeiten konnte eine vielfältige Speziesumwandlung und Methylierung in Blasen- und Leberzellen nach Exposition gegen MMA(III) beobachtet werden. Dabei blieb allerdings ungeklärt wie viel Arsen überhaupt in die Zellen eindringt bzw. in der Zellmembran und anderen, nicht löslichen Zellbestandteilen vorhanden ist. Auch in welcher Form (Methylierungsgrad) es dort vorliegt, blieb unklar. Zudem besteht die Frage wieso und wo in der Zelle eine Oxidation stattfinden kann. Zur Weiterführung dieser Arbeiten sollen Zellen gegen MMA(III) exponiert, aufgearbeitet und analytisch untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit setzt sich so aus verschiedenen Forschungsprojekten und daraus folgenden Publikationen zusammen, die als gemeinsamen Nenner die Speziesanalytik metall(oid)organischer Verbindungen und deren toxische Wirkung haben. Aufgrund der vielen Projekte ist der Themenbereich weit gefächert und wird daher in einen allgemeinen und einen speziellen Teil gegliedert.

Im allgemeinen Teil soll dem Leser zunächst ein Überblick über die Metall(oid)e und Spezies in der Umwelt, deren analytischen Nachweis sowie ein Einblick in toxikologisch relevante Untersuchungen gegeben werden. Dieser Teil zeigt so die Einbindung eigener Arbeiten in die aktuelle Forschung in diesem Bereich.

Im anschließenden speziellen Teil werden einzelne Aspekte in der Speziesanalytik metall(oid)organischer Verbindungen aufgegriffen und ausgewählte, bisher nicht publizierte, aktuelle Forschungsprojekte wie die Speziesbestimmung in der Biogasproduktion (Kapitel 1, Seite 63) oder die Permeation metall(oid)organischer Verbindungen durch Arbeitsschutzmaterial (Kapitel 3, Seite 137) vorgestellt. Auch auf aktuelle, bisher nicht veröffentlichte, weiterführende toxikologische Untersuchungen an humanen Zellen soll nochmals eingegangen werden. Hier soll der Frage nachgegangen werden ob weitere Spezies, wie z.B. Arsenobetain, mit der vorhandenen Methode nachgewiesen werden können, wie viel Arsen in die Zellen eindringt bzw. in der Zellmembran und anderen, nicht löslichen Zellbestandteilen vorhanden ist und in welcher Form (Methylierungsgrad) es dort vorliegt (Kapitel 4.2, Seite 182).

Allgemeiner Teil

Der allgemeine Teil blickt kurz auf die Geschichte der metall(oid)organischen Verbindungen zurück und gibt einen Einblick in deren chemisches Verhalten und Stabilität. Zudem soll verdeutlicht werden, wie in dieser Arbeit der Begriff der Spezierung Verwendung findet.

Aufgrund vieler offener Fragen im analytischen Bereich der metall(oid)organischen (methylierten) Verbindungen gibt der allgemeine Teil dem Leser einen Überblick über diese Substanzen in der Umwelt, deren analytischen Nachweis sowie einen Einblick in toxikologisch relevante Untersuchungen und knüpft so mit eigenen Arbeiten an die aktuelle Forschung in diesem Bereich an.

1. Metall(oid)organische Verbindungen und Spezies

Metall(oid)organische Verbindungen

Die Wiege der metall(oid)organischen Chemie ist wohl eine kleine Pariser Militärapotheke, in der Louis-Claude Cadet de Gassicourt⁴ im Jahre 1757 an der Herstellung unsichtbarer Tinte aus Mineralien arbeitete. Dabei verwendete er Cobalt-Mineralien, die Arsentrioxid (As_2O_3) enthielten und durch Reaktion mit Kaliumacetat eine stinkende, rauchende Flüssigkeit (Cadetsche Flüssigkeit) entwickelten (Elschenbroich, 2008). Ohne es zu wissen hatte er damit die erste arsenorganische Verbindung hergestellt welche später als Kakodyl⁵ bezeichnet wurde. Ihre Struktur konnte allerdings erst 1858 durch Robert Bunsen mit Hilfe einer As-As Bindung als Tetramethyldiarsen ($((\text{CH}_3)_2\text{As}-\text{As}(\text{CH}_3)_2)$) beschrieben werden. Absolut lesenswert ist hierzu das „Cover-Essay“ in Organometallics (20) 2001 (Seyferth, 2001). Im Gegensatz zum 18. Jahrhundert ist die Chemie der Organoarsenverbindungen heute durchaus bekannt (Garje *et al.*, 1999).

Abbildung 1: Louis-Claude Cadet de Gassicourt.

Er synthetisierte 1757 die erste arsenorganische Verbindung.

Zu den flüchtigen metall- und metall(oid)organischen Verbindungen zählen deren Hydride, Alkyle, Carbonyle und einige Halogenide verschiedenster Elemente, wobei eine entsprechend hohe Affinität zu den Elementen Kohlenstoff und Wasserstoff Voraussetzung ist. Elemente mit hoher Affinität zum Wasserstoff sind die so genannten Hydridbildner Arsen, Antimon, Bismut, Bor, Blei, Germanium, Phosphor, Selen, Silizium, Tellur und Zinn. In einer metall(oid)organischen Verbindung ist die Metall(oid)-Kohlenstoff-Bindung (M-C) die thermodynamisch

⁴ * 24. Juli 1731 in Paris - † 17. Oktober 1799 in Paris

⁵ griech. kakados = „stinkend“

instabilste Bindung. Die meisten dieser Verbindungen sind sauerstoffempfindlich und damit unter aeroben Bedingungen nicht stabil. Ihre Bildung kann demnach nur in einer stark reduktiven Atmosphäre erfolgen, bei Kontakt mit der Umgebungsluft werden sie zum Teil rasch demethyliert. Bei den permethylierten Spezies nimmt die Stabilität dieser M-C-Bindung in der Reihenfolge $\text{Bi} < \text{In} < \text{Pb} < \text{Cd} < \text{Hg} < \text{Zn} < \text{Sb} < \text{As} < \text{Sn} < \text{Ga} < \text{Al} < \text{P} < \text{B} < \text{C}$ zu (Feldmann, 1995). Die Spaltung der M-C-Bindung, die aufgrund der unterschiedlichen Elektronegativitäten der Elemente polarisiert ist, erfolgt in den meisten Fällen nicht homolytisch. Methylierte Bismut- und Bleiverbindungen stellen wegen der hohen Elektronegativitätsunterschiede und der damit verbundenen starken Polarisierung der M-C-Bindung die am wenigsten stabilen metallorganischen Verbindungen dar. Die starke Polarisierung wirkt sich ebenfalls negativ auf die Stabilität der Spezies in wässrigen Medien aus. Stark polarisierte M-C-Bindungen sind in Wasser instabil, wohingegen Verbindungen mit niedriger Polarität dieser Bindung im Wasser als stabil gelten. Die Stabilität in biologischen Matrices wird zusätzlich vom pH-Wert und den Redoxbedingungen im jeweiligen Medium beeinflusst. Eine Kettenverlängerung bei den organischen Substituenten verringert die thermische Stabilität der metall- und metall(oid)organischen Verbindungen. Ein genereller Überblick über die Stabilität metall(oid)organischer Verbindungen findet sich in „Organometallic Compounds in the Environment“ (Craig, 2003). Ein Auszug von hier relevanten Verbindungen ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Metall(oid)organische Verbindungen können sich, im Vergleich zu ihren anorganischen Analoga, völlig different verhalten. So unterscheiden sie sich nicht nur, wie eben beschrieben, in ihrer Stabilität sondern auch in der Toxizität (siehe allgemeiner Teil, Kapitel 4, Seite 50), Mobilität, Bioverfügbarkeit und Fettlöslichkeit.

Tabelle 1: Stabilität methylierter metall(oid)organischer Verbindungen gegen Sauerstoff

Stabil	Instabil
$(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$	
$(\text{CH}_3)_4\text{Sn}$; $(\text{CH}_3)_{4-n}\text{SnX}_n$	
$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$, $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$,	$(\text{CH}_3)_3\text{As}^{\text{a)}$, $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$, CH_3AsX_2
$(\text{CH}_3)_2\text{SbO}(\text{OH})$, $\text{CH}_3\text{SbO}(\text{OH})_2$,	$(\text{CH}_3)_3\text{Sb}^{\text{a)}$, $(\text{CH}_3)_2\text{SbH}$, CH_3SbX_2
	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$

^{a)} Stabil in verdünnter Form und bereits in der Umwelt nachgewiesen

(Craig, 2003)

Spezies / Speziierung

Mit den gängigen Standardmethoden wird in der Regel lediglich der Gesamtgehalt eines Elements nachgewiesen. Bei Metall(oid)en, wie Antimon, Quecksilber, Blei, Zinn, Arsen etc. ist allerdings eine Differenzierung der verschiedenen „Spezies“ angebracht. Speziierung (in Anlehnung an die engl. Bezeichnung „speciation“ oder „chemical speciation“) bezeichnet in der Chemie allgemein den Vorgang (d.h. die Herausbildung) chemischer Ausprägungsformen einer Substanz (hier eines Metall(oid)s) wie etwa die Isotopenzusammensetzung, den Oxidationszustand und/oder die Komplex- oder Molekularstruktur. Die Bezeichnung Speziierungsanalyse meint die analytische Aktivität der Identifizierung und/oder Quantifizierung einer oder mehrerer chemischer Spezies in einer Probe, während der Begriff Speziierung die Aufteilung eines Elementes in seine definierten chemischen Spezies in einem System zusammenfasst (Templeton *et al.*, 2000). Als Spezies sollen in der hier vorliegenden Arbeit organometallische Verbindungen (mit unterschiedlichem Methylierungsgrad) bezeichnet werden, die eine einfache Sigmapbindung zwischen Kohlenstoff (Methylgruppe) und Metall in unterschiedlichen Oxidationsstufen aufweisen.

So ist z.B. eine einfache Unterscheidung zwischen den Oxidationsstufen +III und +VI relevant, in denen Chrom in der Natur auftreten kann, da vor allem die Chrom(VI)-Spezies toxisch wirkt. Wesentlich drastischer wirkt sich eine Speziesänderung bei anderen Elementen wie Arsen oder Quecksilber aus. Während Hg^0 , solange es nicht durch Inhalation in den Körper gelangt, als weitgehend „harmlos“ einzustufen ist, gilt Hg^{2+} mit einem LD_{50} -Wert von 1 mg/kg (HgCl_2 / Ratte / MSDS Datenblatt, Acros Organics) als toxisch. Noch weitaus toxischer wirkt das zweifach methylierte Dimethylquecksilber (siehe spezieller Teil, Kapitel 3, Seite 137).

Die Toxizität eines Metalls ist also abhängig von der Verbindung, in der es vorliegt. Die Bestimmung des Gesamtgehaltes eines Elementes in einer Probe ohne Wissensstand der genauen chemischen Verbindung reicht demnach nicht aus, um eine eindeutige Aussage über bedeutende Gesichtspunkte wie Toxizität, Mobilität, Bioverfügbarkeit und Fettlöslichkeit treffen zu können. Die Speziesanalytik spielt hier also eine entscheidende Rolle zur Beurteilung der o.g. Eigenschaften.

2. Metall(oid)organische Verbindungen in der Umwelt

Seit Beginn der industriellen Revolution wurde, neben den natürlichen Quellen, auch anthropogen eine Vielzahl an organischen und anorganischen Verbindungen in die Umwelt eingebracht. Metalle und Metalloide gelangen so auf verschiedenste Wege in unsere Umwelt und unterliegen dort einer ständigen Umwandlung. Dabei spielen gerade Methylierungsreaktionen eine wichtige Rolle. Sowohl biotische als auch abiotische Methylierung der Metalle und Metalloide erfolgt in der Umwelt unter anaeroben oder aeroben Bedingungen. Als Biomethylierung wird dabei der Prozess bezeichnet, bei dem durch Mikroorganismen chemische Bindungen zwischen einer oder mehreren Methylgruppen ($-\text{CH}_3$) und einem Metall bzw. Metalloid gebildet werden. Die Biomethylierung ist ein durchaus üblicher und bekannter Prozess in lebenden Organismen, wobei die biologische Funktion dieser Methylierungsreaktionen noch immer nicht völlig geklärt ist (Woggon *et al.*, 1983). Voraussetzung zur Biomethylierung ist, dass zum Einen relativ hohe Konzentrationen an Metall(oid)en (allerdings unter der zytotoxischen Wirkungsschwelle) in leicht zugänglichen Formen (beispielsweise Ionen) zur Verfügung stehen, zum Anderen, dass entsprechend befähigte Mikroorganismen sowie Methylgruppen-Donoren vorhanden sind.

Die mikrobielle Umwandlung von Arsen zu Methylarsen konnte erstmals vor über 150 Jahren nachgewiesen werden. Bereits in den Jahren ab 1891 zeigte B. Gosio (Gosio, 1892) mit seinen Versuchen, dass verschiedene Mikroorganismen Arsenverbindungen methylieren können. Dazu versetzte er Kartoffelpüree mit Arsenoxid sowie Bakterien bzw. Pilzkulturen und setzte diese der Luft in einem Keller aus. Während die mit Bakterien versetzten Versuchsreihen geruchfrei blieben, zeigten einige Pilzkulturen (*Penicillium glaucum*, *Aspergillum glaucus*, *Scopulariopsis brevicaule*) den unverkennbaren Knoblauchgeruch (Bentley, 2001). Erst Challenger identifizierte diese Verbindung als Trimethylarsin und bezeichnete sie fortan als „Gosio-Gas“ (Challenger *et al.*, 1933). Im Jahre 1945 postulierte Challenger dann den ersten Mechanismus zur Biomethylierung des

Arsens (Challenger, 1945). Die Umwandlung von wasserlöslichem Arsenat zu flüchtigem Trimethylarsen ist ein vielstufiger Prozess, bei dem das Arsenat zunächst zum Arsenit reduziert und anschließend oxidativ methyliert wird. Diese Reduktion mit anschließender oxidativer Methylierung kann bis zum Trimethylarsen fortgeführt werden. Den postulierten Methylierungspfad der Reduktion und anschließenden oxidativen Methylierung zeigt Abbildung 2.

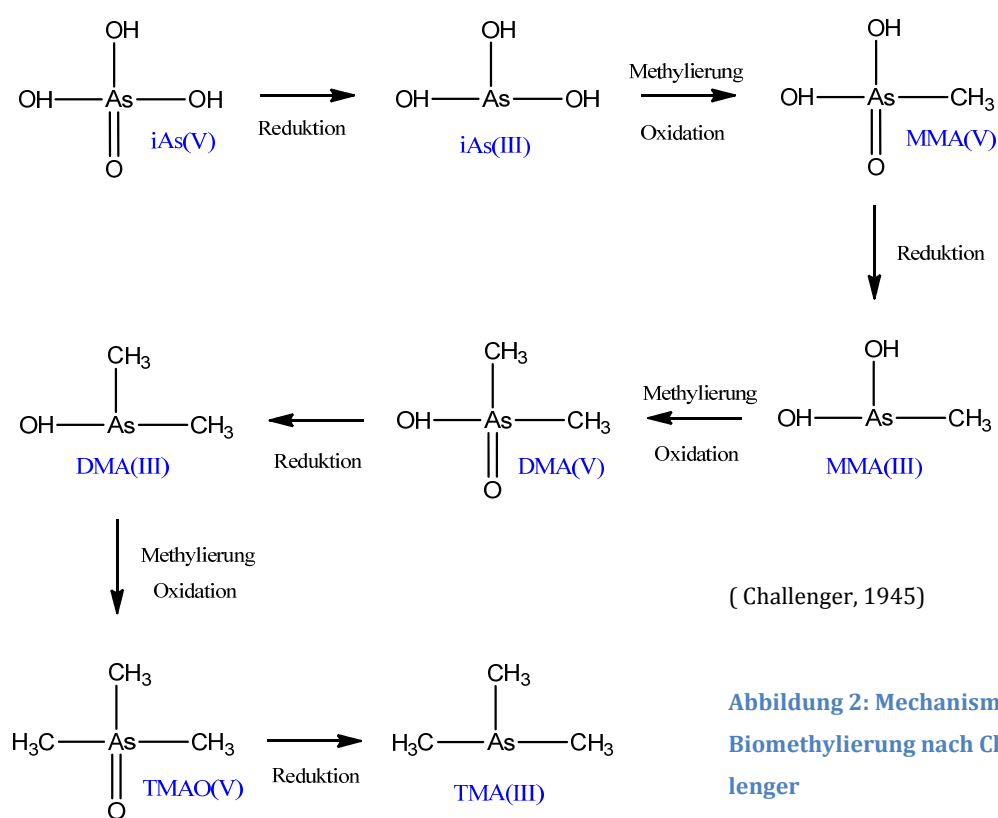


Abbildung 2: Mechanismus der Biomethylierung nach Challenger

Folgestudien zeigten auch für Selenit und Tellurit eine Umwandlung zu Dimethylselen und Dimethyltellur (Challenger, 1951). Später stellte man fest, dass auch Bakterien und tierisches Material diese Fähigkeit zur Methylierung besitzen (Aposhian, 1997). Michalke *et al.* postulierten einen vergleichbaren Mechanismus auch für Bismut (Michalke *et al.*, 2007).

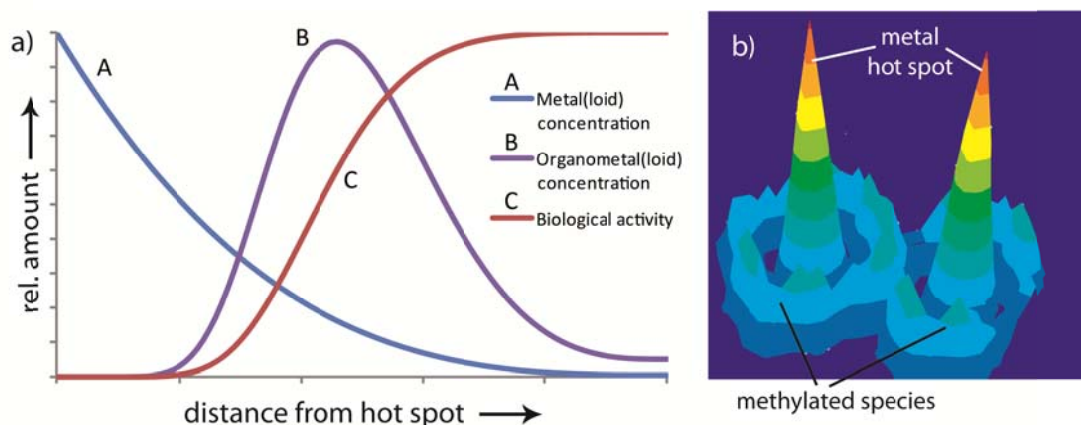
Aus umwelttoxikologischer Sicht ist die Biomethylierung von großer Bedeutung, da Mikroorganismen auf diese Art eine Entgiftung ihres Lebensraumes erreichen können.

Organische (methylierte) Derivate können sich, wie bereits zuvor beschrieben, im Vergleich zu den anorganischen Analoga völlig different verhalten. Bei vollständig ablaufender Biomethylierung entstehen so permethylierte Metalle und Metalloide, die einen hohen Dampfdruck aufweisen und leicht in die Atmosphäre gelangen können. Zwar sind viele dieser Verbindungen instabil gegenüber ultravioletttem Licht, Wasser oder Sauerstoff (vgl. Kapitel 1, Seite 9), ihre Abbauprodukte bleiben jedoch partikulär gebunden und/oder gelangen als teilmethylierte oder anorganische Verbindungen zurück in die Geosphäre. Die Biomethylierung führt so, aufgrund der gesteigerten Mobilität der Metall(oid)e, zu einer Metallverfrachtung in der Umwelt. Ein typisches Beispiel ist hier der in Kapitel 2.5 (allgemeiner Teil, Seite 32) aufgeführte Quecksilberkreislauf.

Die Übertragung der Methylgruppen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Die der Biomethylierung zugrunde liegenden molekularen Prozesse sind von der Eigenschaft der Metalle bzw. Metalloide sowie von den beteiligten Organismen abhängig. Sie kann enzymatisch katalysiert, durch mikrobielle Aktivität vermittelt oder als rein chemische Reaktion ablaufen, wobei in den meisten Fällen der Mechanismus der Methylgruppenübertragung weitgehend ungeklärt ist. Als biochemische Methylendonoren fungieren je nach Art der Mikroorganismen S-Adenosylmethionin (SAM), Gluthathion (GSH) und andere Thiole oder Methylcobalamin. Für Methylcobalamin konnte in steriler Umgebung eine Methylierungsaktivität gezeigt werden, ebenso für Natriumthioglykolat und einige Sulfide. Nicht nur Bakterien, Pilze, Pflanzen oder Algen, sondern auch Tiere und der menschliche Organismus sind in der Lage, anorganische Metalle und Metalloide in methylierte Verbindungen zu überführen (Kresimon, 2002).

Aufgrund der toxischen Wirkung (siehe auch allgemeiner Teil, Kapitel 4, Seite 50) vieler Metall(oid)e, ist bakterielles Leben an hoch belasteten Standorten (so genannten „HotSpots“) allerdings kaum möglich, was zur Folge hat, dass an sol-

chen Metall(oid)-HotSpots auch nur mit einer geringen Bildung metall(oid)organischer Verbindungen zu rechnen ist. Folgt man aber der abnehmenden Metall(oid)konzentration mit größer werdendem Abstand zum HotSpot, so nimmt sowohl die biologische / bakteriologische Aktivität als auch die Methylierungsrate zu. Wobei die letztgenannte bei weiter steigendem Abstand zum Kontaminationspunkt wieder abnimmt, da dort die Metall(oid)konzentrationen zu gering werden (Hirner *et al.*, 2011). Diese räumliche Verteilung ist in Abbildung 3 dargestellt. Sie zeigt, dass die Maxima der Konzentrationen der Metall(oid)e und der methylierten Metall(oid)e nicht zusammenfallen („Halo-Hypothese“).



(Hirner und Hippler 2011)

Abbildung 3: Metall(oid)speziesverteilung an kontaminierten Standorten. (a) Metall(oid)organische Speziesverteilung in Abhängigkeit der Metall(oid)konzentration und der biologischen Aktivität sowie (b) ringförmiger Bereich methylierter Spezies um eine Metall(oid) Hot-Spot Kontamination.

2.1 Arsen und methylierte Verbindungen

Als drittes Element der 15. Gruppe im Periodensystem zählt Arsen (As) zu den Halbmetallen und kommt ubiquitär im Boden in geringen Konzentrationen, da-



Abbildung 4: Realgar (As_4S_4 , auch Rauschrot) wird in Ablagerungen von heißen Quellen oder als vulkanisches Sublimationsprodukt gefunden. Die Schönheit von Realgar ist vergänglich: Es ist ein nicht stabiles Mineral und zerfällt langsam zum Auripigment (As_2S_3).

bei aber nur selten gediegen, vor. Weltweit gehören arsenhaltige Minerale zu den häufig in Erzlagerstätten anzutreffenden Begleitmineralen. Mit einem Vorkommen von etwa 2 mg/kg (Greenwood *et al.*, 1990) gehört Arsen weder zu den am häufigsten, noch zu den selten vorkommenden Elementen der Erdkruste. Zu den meist anzutreffenden Mineralen gehören die beiden Sulfide Realgar (As_4S_4 ; Abbildung 4) und Auripigment (As_2S_3 ; lateinischen "auripigmentum"; goldenes Pigment) sowie die gemischten Sulfide von Eisen (Fe) und Nickel (Ni) wie z.B. Arseneisen (FeAs_2), Arsennickelkies (NiAs) oder Arsenkies (FeAsS). Technisch wird Arsen durch

Schmelzen von FeAsS bei 650 bis 700°C unter Luftabschluss und Kondensation des sublimierenden Elements gewonnen. Es fällt ebenfalls als ein Nebenprodukt bei der Herstellung von Kupfer, Blei, Kobalt, Zink und Gold an. Elementares Arsen kommt in verschiedenen Modifikationen vor, wobei graues Arsen die thermodynamisch beständigste Form ist. Kühlt man Arsendampf schnell ab, so bildet sich das metastabile gelbe Arsen. Lässt man den Arsendampf an 100 bis 200°C warmen Oberflächen abkühlen, so entsteht das amorphe schwarze Arsen (Riedel, 2004).

Elementares Arsen wird in Legierungen (Letternmetall, Lötmittel, Akkumulatoren) sowie in der Halbleiterindustrie, dort meist in Form von Galliumarsenid (GaAs) unter Verwendung von CVD-Techniken⁶ eingesetzt (Housecroft *et al.*,

⁶ Chemical Vapour Deposition; Chemische Abscheidung von (metallorganischen) Dämpfen an heißen Oberflächen zur Erzeugung dünner Filme.

2006). Weltweite Verwendung findet Arsen noch immer in Holzschutzmitteln des Typs CCA (chromated copper arsenate) (Bringezu, 1990). In den USA ist die private Nutzung von CCA-behandeltem Holz mittlerweile verboten (University of Illinois, 2002) und auch in der Europäischen Union wurde das Inverkehrbringen und die Anwendung arsenhaltiger Holzschutzmittel stark eingeschränkt (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, 2003).

Arsentrioxid (Arsenik) ist schon lange als Mordgift gefürchtet (letale Dosis etwa 100 – 200 mg). In der Antike war es das am meisten verwendete Gift. Arsenikgebrauch war auch im 19. Jahrhundert, vor allem in der Steiermark und in Tirol, üblich (Arsenesser)⁷ um „gesund und stark zu bleiben“ oder die Potenz zu steigern (Schäfer, 1861). Zur gleichen Zeit fand Arsen reichlich Verwendung als grünes Pigment (Scheeles Pigment oder Schweinfurter Grün) zum Färben von Tapeten, Anstrichen, Wandteppichen oder Kleidung; wenngleich schon damals vor deren Verwendung gewarnt wurde (Chasteen *et al.*, 2002) und lange Zeit nicht klar war, ob Partikel aus den Tapeten (Emmerling, 1896) oder flüchtige Arsenverbindungen für zahlreiche Krankheiten und Todesfälle verantwortlich waren (Gosio, 1897). Aber auch in der Medizin spielt(e) Arsen eine bedeutende Rolle. Vor einem Jahrhundert war das von Paul Ehrlich synthetisierte Salvarsan (3,3'-Diamino-4,4'-dihydroxy arsenobenzol) das erste Arzneimittel gegen die Syphilis⁸ und stellte einen Meilenstein in der Arzneimittelforschung dar, bevor es später durch Penicillin abgelöst wurde. Zuvor wurden Arsenverbindungen, namentlich Atoxyl (Natriumhydrogenarsanilat), bereits gegen Trypanosoma, dem Erreger der Schlafkrankheit eingesetzt (Uhlenhut *et al.*, 1907). Noch heute werden arsenhaltige Arzneimittel wie TRISENOX® (Wirkstoff: Arsentrioxid; Zulassung 2002) (EPAR, 2007) zur Bekämpfung mancher Krebsarten wie Leukämie angewandt (Antman, 2001). Auch in der Homöopathie, hier oft als „Arsenicum al-

⁷ Siehe hierzu auch: Chymatrie.de; Die Arsenesser aus der Steiermark; Prof. J. Feldmann (University of Aberdeen); <http://vimeo.com/15247441>

⁸ Eine interessante Kurz-Dokumentation über Paul Ehrlich, Syphilis und Salvarsan findet sich unter: <http://lexi-tv.de/themen/gesundheit/infektionen>

bum“ (weißes Arsen, arsenige Säure) bezeichnet, sowie in der traditionellen chinesischen Medizin ist Arsen seit über 2000 Jahren und bis heute von Bedeutung. Früher wie heute wird es hier gegen viele verschiedene Leiden wie Ruhelosigkeit, Angst, Erschöpfung, Schwäche, brennende Schmerzen oder Frösteln eingesetzt. Einen hervorragenden Überblick über die Vorkommen und die Verwendung von Arsen gibt William Cullen in seinem Buch „Is Arsenic an Aphrodisiac? The Sociochemistry of an Element“ (Cullen, 2008).

Wie bereits zu Anfang beschrieben, war Kakodyl (Tetramethyldiarsen) die wohl erste bekannte arsenorganische Verbindung. Trimethylarsin ($(\text{CH}_3)_3\text{As}$) ist ein weiteres, populäres Beispiel für einfache arsenorganische Verbindungen. Besser bekannt ist diese Verbindung als „Gosio-Gas“, benannt nach dem italienischen Physiker Bartolomeo Gosio (1863 – 1944). Lange galt Trimethylarsin als besonders giftig und wurde für viele Todesfälle Ende des 19. Jahrhunderts verantwortlich gemacht. Neuere Untersuchungen deuten allerdings auf eine vergleichsweise geringe akute Toxizität hin (Cullen *et al.*, 2005). Innerhalb der in Kapitel 4 (spezieller Teil, Seite 163) durchgeführten Arbeiten wird die Toxizität dieser und weiterer leichtflüchtiger Verbindungen auf unterschiedliche Zellarten untersucht.

Heute ist die Chemie der Organoarsenverbindungen durchaus bekannt (Garje *et al.*, 1999). Die Bindung zwischen Kohlenstoff und Arsen ist in der Regel gegen Wasser beständig. So können Alkyl-Arsen-Säuren (allgemeine Formel: $\text{RAsO}(\text{OH})_2$ bzw. $\text{R}_2\text{AsO}(\text{OH})$) wie Monomethyl- oder Dimethylarsin-Säure, welche auch als Kakodylsäure bezeichnet wird, mittels der Meyer-Reaktion aus Natrium-Arsenit und Alkyl-Halogeniden gewonnen werden. Diese Verbindungen finden sich auch als Hauptmetabolite im menschlichen Urin wieder.

Die entsprechenden Aryle erhält man leicht durch die Bart-Reaktion aus Diazonium-Salzen mit Na-Arsenit (Goates *et al.*, 1972). Die trivalenten Arsenspezies erhält man am einfachsten durch Reduktion der entsprechenden pentavalenten Verbindung mittels Schwefeldioxid (SO_2) (siehe Synthese des Dimethylarseniodids im speziellen Teil, Kapitel 4.1.2.2, Seite 166). Während Arsen im Wasser

und in Erzlagerstätten meist in anorganischer Form vorkommt, finden sich in Pflanzen und Tieren viele organische Arsenverbindungen.

Algen enthalten weitaus komplexere Arsenspezies, wie z.B. verschiedene Arsenozucker. Die Grundstruktur dieser Arsenverbindungen ist in Tabelle 2 aufgeführt. In Fischen und Meeresfrüchten findet sich hingegen hauptsächlich Arsenobetain aber auch Arsenocholin (Tabelle 2) sowie weitere, einfache methylierte Arsenspezies. Eine ausführliche Liste dieser Verbindungen findet sich in verschiedenen Literaturquellen (Edmonds *et al.*, 2003; Kuehnelt *et al.*, 2003).

Tabelle 2: Auswahl einiger häufig vorkommender organischer Arsenspezies. Eine ausführliche Liste sowie die möglichen Reste (R) der Arsenozucker befinden sich im Anhang

Formel	Bezeichnung	Formel	Bezeichnung
$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Monomethylarsonsäure	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3-\text{As}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array} \begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Arsenozucker
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{As} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Trimethylarsin	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{As}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Arsenocholin
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Dimethylarsinsäure	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{As}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Arsenobetain

Hauptexpositionspfad für Arsen ist in vielen Teilen der Welt arsenhaltiges Grund- und Trinkwasser, aber auch der Verzehr von Meeresfrüchten bzw. Algen. In vielen Regionen finden sich Arsenkonzentrationen im Trink- und Grundwasser, die weit oberhalb des von der WHO empfohlenen Grenzwertes von 10 µg/l liegen (WHO, 2001). Mit Arsen belastetes Wasser stellt eine Bedrohung für Millionen von Menschen dar (Ng *et al.*, 2003). In den großen bekannten Problemgebieten wie Bangladesch, Vietnam und Lateinamerika ist der geogene Ursprung dieser Belastung inzwischen nachgewiesen. Einen Überblick über arsenbelastete

Gebiete in Folge geologischer Quellen (Erosion), Bergbau bzw. geothermaler Quellen ist in Abbildung 5 gegeben. Siehe auch Smedley *et al.* (Smedley *et al.*, 2002) sowie Mukherjee *et al.* (Mukherjee *et al.*, 2006).



(Smedley et al. 2002)

Abbildung 5: Weltweiter Überblick über Gebiete mit bekannter, dokumentierter Arsenproblematik im Grundwasser sowie Arsenkontaminationen durch Bergbau bzw. geothermale Quellen.

Auch in Deutschland sind Gegenden mit natürlich erhöhten Arsengehalten in (Sediment-) Gesteinen und damit teilweise verbundene kritische Konzentrationen im Grundwasser (As-Grenzwert 10 µg/l) bekannt. Beispiele hierfür finden sich in Franken und Oberbayern, aber auch in München im Freisinger, Erdinger und Dachauer Moos; in Südniedersachsen, dem Rheinland sowie dem südlichen Münsterland, lediglich 40 km nordöstlich der Universität Duisburg-Essen. Hier konnten in der Heubachniederung zwischen Haltern und Dülmen Arsenanreicherungen im grundwasserbeeinflussten Boden (Trinkwasserschutzgebiet) von mehr als 50 mg/kg nachgewiesen werden (Banning *et al.*, 2009). Auch im Einzugsbereich des Dattelner Mühlenbaches finden sich Teilbereiche, in denen die Arsenkonzentrationen im Boden den Wert von 125 mg/kg überschreiten

(Institut für Stadtökologie und Bodenschutz, 2011). Betroffen sind sowohl Böden in Wohngebieten, in denen Arsenkonzentrationen von bis zu 350 mg As/kg gemessen wurden (Kreis Recklinghausen, 2011), aber auch Böden landwirtschaftlicher Flächen (Kreisverwaltung Recklinghausen, 2011).

Im Trinkwasser vorhandenes Arsen stammt meist aus Lösungsvorgängen von an Arsen angereicherten Mineralen. Die primären Quellen von Arsen sind meist arsenhaltige Erze wie Arsenkies. Diese Minerale sind weit verbreitet und ihre Verwitterung setzt Arsen in wasserlöslicher Form frei, wobei der genaue Mechanismus der Mobilisation sowie die Anreicherung bzw. der Transport im Grundwasser noch nicht vollständig geklärt ist.

Neben der Belastung durch Trinkwasser und Luft spielt auch die Aufnahme von Arsen durch Nahrungsmittel wie Reis, Fisch, Algen und anderen Meeresfrüchten, die hohe Arsenkonzentrationen enthalten können, eine bedeutende Rolle. So warnte beispielsweise im Juli 2004 die englische „Food Standards Agency of the UK“ vor dem Verzehr von Hijiki (*hijikia fusiforme*, schwarzes Seegras) aufgrund des hohen anorganischen Arsengehaltes von bis zu 100 mg/kg (Food Standards Agency of the UK, 2004).

In zahlreichen Versuchen mit Minischweinen, Ziegen, Kühen und verschiedenen Labortieren wurde die Bedeutung von Arsen auch als essentielles Element (Ultrapurenelement) für die Ernährung von Tieren nachgewiesen (McDowell *et al.*, 2003). In der Landwirtschaft werden organische Arsenverbindungen u.a. als Unkraut- und Schädlingsbekämpfungsmittel (z.B. Natriummethylarsenat oder Dimethylarsensäure) sowie, vorwiegend in den USA, in der Geflügel- und Schweinemast eingesetzt (Chapman *et al.*, 2002) und finden als Futterzusatzstoff Verwendung (z.B. in Form von Roxarson). Ein Großteil dieser Verbindungen wird unverändert wieder ausgeschieden und findet sich in den Exkrementen dieser Tiere wieder. Garbarino *et al.* konnten Arsenat als Hauptabbauprodukt des Roxarsons ausmachen (Garbarino *et al.*, 2003), welches nach dem oben genannten Challenger-Mechanismus, Abbildung 2, Seite 14) weiter in methylierte Spezies umgewandelt werden kann (Momplaisir *et al.*, 2001). Auch bei der Kompostie-

rung konnte die Bildung von methylierten Arsenverbindungen (vornehmlich Monomethylarsen; MMA(III)) aus Roxarson gezeigt werden (Raabe *et al.*, 2006). Die im speziellen Teil dieser Arbeit durchgeführten eigenen Untersuchungen an Anmaischbehältern, Nachgärern sowie Kondenswasserabscheidern von Biogasanlagen zeigen auch hier das Auftreten verschiedener methylierter Arsenspezies in diesem Probenmaterial (siehe spezieller Teil, Kapitel 1, Seite 63).

2.2 Antimon und methylierte Verbindungen

Auch Antimonverbindungen waren bereits in der Antike bekannt, wobei das Sulfid (Grauspießglanz) schon damals zum Schwärzen der Augenbrauen benutzt wurde. Plinius⁹ gab dem Element den Namen „*Stibium*“; etwa ab dem Jahre 800 findet sich auch die Bezeichnung „*Antimonium*“ in der Literatur wieder (Greenwood *et al.*, 1990).

Wichtigstes Antimonmineral ist der bereits erwähnte Grauspießglanz (Sb_2S_3), wobei Antimonminerale mit 0,2 ppm etwa 10-mal seltener vorkommen als Arsen. Im Gegensatz zu Arsen, welches monoisotopisch vorliegt, existieren von Antimon zwei stabile Isotope: ^{121}Sb und ^{123}Sb .

Verwendung findet Antimon überwiegend in Legierungen (Letternmetall, Blei-Akkumulatoren), aber auch bei der Herstellung von Halbleitern, in Bremsbelägen (in Form von Antimontrisulfid) und als Katalysator zur PET Herstellung. Aktuelle Forschungen zeigen, dass Antimon aus diesen PET-Verpackungen ausgewaschen werden kann und so z.B. in Fruchtsäften in fast dreifach höherer Konzentration, verglichen mit dem zulässigen EU-Grenzwert (5 µg/l) für Trinkwasser, nachweisbar ist (Hansen *et al.*, 2010). Auch in der Medizin findet es Anwendung und wird z.B. gegen Tropenkrankheiten eingesetzt (Fowler *et al.*, 1991). Die Chemie des Antimons und auch die Toxizität entspricht weitgehend

⁹ Gaius Plinius Secundus Maior, römischer Gelehrter, *etwa im Jahre 23 - † 25. August 79.

der des Arsens. Wie beim Arsen sind auch beim Antimon dreiwertige Spezies toxischer als fünfwertige. Antimon wird irreversibel an schwefelhaltige Enzyme gebunden. Zielorgane sind auch hier Lunge, Herz, Leber und Niere (Hirner *et al.*, 2000).

Anorganische sowie organische Sb-Spezies lassen sich analytisch analog den Arsenspezies bestimmen. Dazu gehören sowohl HPLC-Methoden als auch die Hydridgenerierung.

Im Gegensatz zu Arsen sind für die Biomethylierung der Elemente Antimon und Bismut (siehe Kapitel 2.3) aber erst in neuerer Zeit Nachweise erbracht worden. So weiß man, dass Trimethylantimon durch Mikroorganismen gebildet werden kann, über die Entstehung im menschlichen Organismus ist jedoch wenig bekannt. Trimethylantimon konnte sowohl in Reinkulturen von Schimmelpilzen (*Scopulariopsis brevicaulis*) (Craig *et al.*, 1999) als auch unter anaeroben Bedingungen in der Gasphase über Bodenproben, welche mit Antimon(III)salzen versetzt wurden, nachgewiesen werden (Jenkins *et al.*, 1998). Aufgrund seiner Toxizität und der Verwendung von Antimon in Matratzen als Flammenschutzmittel, in denen es durch Mikroorganismen methyliert wird, wurde es auch für das Auftreten des plötzlichen Kindstodes (engl. „Sudden Infant Death Syndrome“; SIDS) verantwortlich gemacht. Allerdings konnte bisher kein überzeugender kausaler Zusammenhang zwischen der Trimethylantimonkonzentration im „Headspace“ der Matratzen und dem plötzlichen Kindstod hergestellt werden (Bentley *et al.*, 2002).

Für die Methylierung von Antimon postulierten Andrewes *et al.* einen Mechanismus analog dem des Arsens, wobei nicht alle Ergebnisse des Arsens mit Antimon wiederholbar sind (Andrewes *et al.*, 2000).

2.3 Bismut und methylierte Verbindungen

Bismut steht, wie Arsen und Antimon, in der 15. Gruppe des Periodensystems und vervollständigt diese somit. Während Arsen und Antimon als Halbmetalle oder Metalloide bezeichnet werden, ist Bismut ein typisches Metall wie Zinn oder Blei. Seine Häufigkeit in der Erdkruste (0,008 ppm) liegt in der Größenordnung einiger der häufigeren Platinmetalle (Pd, Pt) und Gold. Wie Arsen, so besitzt auch Bismut nur ein stabiles Isotop (^{209}Bi). Bekannt ist Bismut mindestens seit 1480 und findet seit dem große Verwendung als Legierungsbestandteil, u.a. als Letternmetall (Greenwood *et al.*, 1990). Bismut ist in erster Linie dreiwertig, allerdings gibt es auch ein- und fünfwertiges Bismut; Bismut(V)-oxid ist jedoch ein sehr starkes Oxidationsmittel. In aromatischen Organobismutverbindungen ist ebenfalls fünfwertiges Bismut bekannt. Von den aliphatischen Verbindungen sind im Gegensatz dazu nur die Trialkylbismutverbindungen (z.B. CH_3Bi) stabil (Gilman *et al.*, 1942). Allgemein wird Bismut als weitgehend ungiftig eingestuft (Palmieri, 1993) und daher häufig als Bleiersatz verwendet (Wiberg *et al.*, 2001). Bismut-Schwefel Verbindungen gelten bei intakter Haut mit einem LD_{50} -Wert von 5.000 mg/kg als völlig harmlos (Rohr, 2002). Als so genanntes „grünes Element“ (Rohr, 2002) wird Bismut vielfach in kosmetischen und pharmazeutischen Produkten, unter anderem zur Behandlung von Magenschleimhautentzündungen und Magen-Darmgeschwüren, eingesetzt (Sun *et al.*, 2004); hier meist in Form von anorganischen Bismutverbindungen. Aber auch organische Spezies wie z.B. Bismut-Subgallat finden zur Behandlung von Magen-Darmerkrankungen Verwendung und können als „interne Deodorants“ bei künstlichen Darmausgängen eingesetzt werden (American Cancer Society, 2011). Bekannt ist, dass Schwermetalle wie Quecksilber im lebenden Organismus Komplexe mit Schwefel beinhaltenden Molekülen wie Cystein oder Glutathion bilden (siehe auch Kapitel 2.5, Seite 31). Wie Burford *et al.* zeigen konnten, ist so auch die Bildung von Bismutcystein und Bismutglutathion möglich (Burford *et al.*, 2003). Die Speziesanalytik von Bismut erfolgt in der Regel mittels LC-MS bzw. LT-GC/ICP-MS. Im Gegensatz zu anorganischem Bismut sind organische, permethylierte Bismutverbindungen (Trimethylbismut) wesentlich toxi-

scher, wie es von Sollmann *et al.* durch Experimente mit Katzen und Hunden gezeigt werden konnte (Sollmann *et al.*, 1939). Aber auch nach der Einnahme / Gabe von anorganischen Bismutverbindungen sind Fälle aus Frankreich und Australien dokumentiert, in denen es zu enzephalopathischen Erkrankungen gekommen ist (Burns *et al.*, 1974); (Buge *et al.*, 1976). Es wird angenommen, dass die beobachteten Symptome durch die Umsetzung von anorganischem Bismut zu Trimethylbismut (Me_3Bi) durch Darmbakterien hervorgerufen werden können (Michalke *et al.*, 2002). Die mikrobielle Bildung des Trimethylbismuts wurde auch in einigen anderen Studien nachgewiesen. So konnte bei Anwesenheit der in Kosmetik- und Haushaltsprodukten enthaltenen Polydimethylsiloxane (D4 und D5) eine Methylierung von Bismut in Abwässern gezeigt werden. Auch eine Kultur des methylcobalaminproduzierenden Methanogens „*Methanosarcina barkeri*“ ist alleine nicht in der Lage zugesetztes Bismut zu methylieren. Wurde die Kultur aber zusätzlich mit D4 und D5 versetzt, lies sich Trimethylbismut nachweisen (Kresimon, 2002). Nachfolgende Studien führten den fördernden Einfluss von D4 auf die Trimethylbismutproduktion auf dessen ionophor-ähnliche Wirkungsweise zurück (Meyer, 2002).

Dieser Zusammenhang ist bei der aktuell geführten Diskussion über defekte / minderwertige Brustimplantate¹⁰, aus denen diese leichtflüchtigen Polydimethylsiloxane möglicherweise in großen Mengen ins Blut gelangen könnten, bei gleichzeitiger Verwendung von kosmetischen Produkten die Bismutverbindungen enthalten oder gleichzeitiger Einnahme von Bismutpräparaten wissenschaftlich besonders interessant, aber auch besorgniserregend.

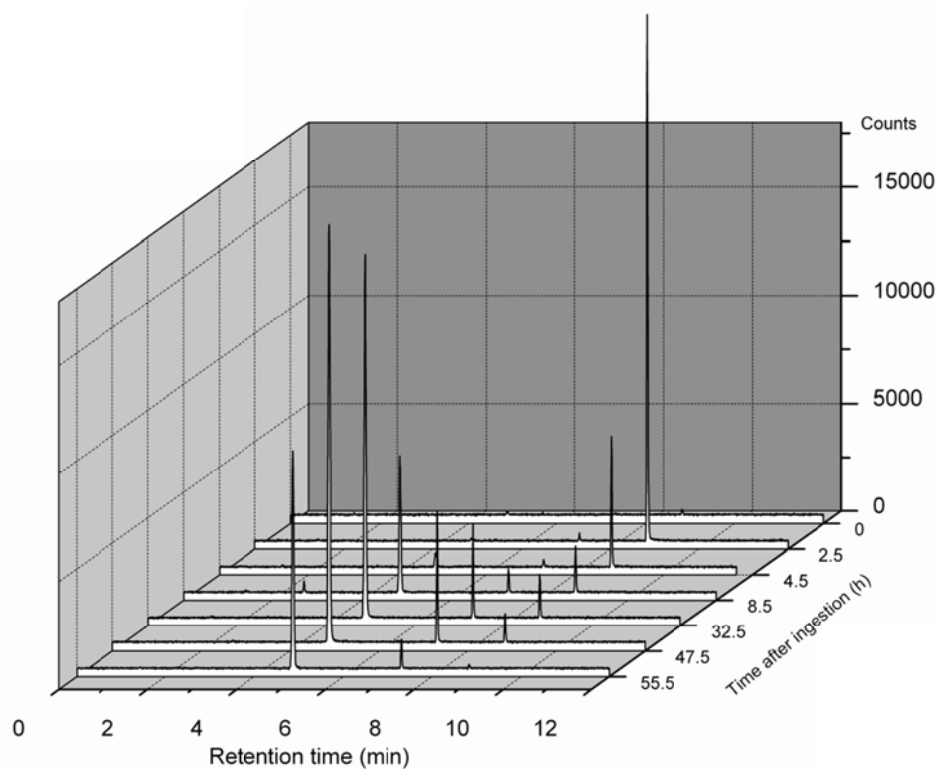
¹⁰ Silikon-Brustimplantate (PIP / Poly Implant Prothesen) wurden im März 2010 verboten, nachdem plastische Chirurgen in Frankreich auf eine erhöhte Rupturrate hingewiesen hatten. Anschließend Untersuchungen der AFSSaP (Französische Agentur für die Sicherheit von Gesundheitsprodukten) hatten ergeben, dass eine brüchigere äußere Silikonhülle sowie ein minderwertiges Industrie-Silikongel als Füllgel verwendet wurde (Etat des lieux des contrôles opérés par les autorités sanitaires sur la société Poly Implant Prothèse, Paris, 07.12.2011).

Michalke *et al.* wiesen Trimethylbismut in der Gasphase auch über einer Reinkultur von *Methanobacterium formicicum* nach. Boertz *et al.* konnten diese Verbindung nach der Einnahme von kolloidalem Bismutsubcitrat sowohl im Blut (2,50 pg/ml) als auch in der Ausatemluft (0,8 bis 458 ng/m³) nachweisen (Boertz *et al.*, 2009). Somit ist auch die direkte toxikologische Wirkung dieser Substanz auf Zellen von großem Interesse und wird daher im speziellen Teil (Kapitel 4.1, Seite 163) nochmals aufgegriffen. Allerdings tendieren alkylierte Bismutspezies dazu sich in Wasser zu zersetzen, was die Bedeutung von Bismutcysteinkomplexen im Bereich der Bismutmethylierung in wässrigen Lösungen unterstreicht. Hippler *et al.* konnten zeigen, dass eine Komplexierung durch Cystein die Stabilität von Methylbismut erhöht, konnten diese Verbindung synthetisieren und mittels ESI-HR-TOF-MS identifizieren (Hippler *et al.*, 2009a).

Von Recklinghausen *et al.* beobachteten die Aufnahme von Bismutglutathion und Bismutcitrat durch humane Erythrocyten, Lymphocyten und Hepatocyten (von Recklinghausen *et al.*, 2008). Die Autoren nehmen an, dass die Biomethylierung von anorganischem Bismut im menschlichen Darm stattfindet. Es ist aber auch eine Methylierung in der Leber vorstellbar, wie es bereits von Styblo *et al.* für Arsen anhand von HepG2 – Zellen gezeigt werden konnte (Styblo *et al.*, 1999).

Hollmann *et al.* untersuchten daher die Bildung von Methylbismutspezies durch humane Leberzellen (HepG2) mittels simultaner EI-MS/ICP-MS nach Derivatisierung mittels Natriumtetraethylborat und gaschromatographischer Trennung wie sie bereits von Kösters *et al.* beschrieben wurde (vgl. Kapitel 3.3, ab Seite 44). Die Gruppe konnte zeigen, dass sowohl Bismutsubcitrat als auch Bismutcystein durch HepG2 – Zellen methyliert wird. Bei der Inkubation der Zellen gegen Bismutglutathion konnte hingegen keine Bildung von Methylbismutverbindungen beobachtet werden (Hollmann *et al.*, 2010). Auch hier ist die Frage, welche zyto- und genotoxischen Wirkungen diese Spezies, insbesondere die des Trimethylbismuts, auf HepG2 und weitere Zellen haben, ungeklärt und wird daher in Kapitel 4.1 des speziellen Teils (Seite 63) untersucht.

Den zeitlichen Verlauf der Ausbildung unterschiedlich methylierter Bismutspezies im Blut konnten Hippler *et al.* zeigen (Hippler *et al.*, in Vorbereitung). Sowohl vor als auch nach der Einnahme eines Bismutcitrat enthaltenden Medikamentes wurden den Probanden Blutproben über einen Zeitraum von 56 Stunden entnommen. Die Speziesbestimmung erfolgte auch hier mittels parallel betriebener GC-MS/ICP-MS Kopplung nach Derivatisierung (Ethylierung). Dabei konnte ein zeitversetzter Anstieg und Abfall der Bismutspezies Bi^{3+} (anorganisch), Monomethylbismut $(\text{CH}_3)\text{Bi}^{2+}$ und Dimethylbismut $(\text{CH}_3)_2\text{Bi}^+$ im Humanblut beobachtet werden (Abbildung 6). In einer Probe (8,5 Stunden nach Ingestion) konnte zudem eine vierte Spezies detektiert werden.



(Hippler *et al.*, in Vorbereitung)

Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der Bildung von methylierten Bismutspezies im Humanblut nach Einnahme eines Bismutcitrat enthaltenden Medikamentes. Retentionszeiten der Bi-Spezies nach Ethylierung: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$, 2,7 Min.; $(\text{CH}_3)_2\text{Bi}^+$, 4,9 Min.; $(\text{CH}_3)\text{Bi}^{2+}$, 7,3 Min. und Bi^{3+} , 8,8 Min.

Auch wenn die Sensitivität der parallel gekoppelten EI-MS in diesem Falle nicht ausreichend zur Erstellung eines Massenspektrums war, so entspricht die Retentionszeit dieser Verbindung doch der des Trimethylbismuts (CH_3)₃ und kann so mittels Siedepunkt-Retentionszeit-Korrelation (siehe Kapitel 3.3, Seite 44) identifiziert werden.

2.4 Zinn und methylierte Verbindungen

Zinn (Sn) ist das Element, welches die meisten stabilen Isotope besitzt. In Tabelle 3 sind die Massen und die relative Häufigkeit der natürlichen Zinnisotope aufgelistet, wobei die Isotope mit der Masse 116, 118 und 120 am häufigsten vorkommen und dadurch für die massenspektrometrische Detektion bevorzugt werden.

Tabelle 3: Massen und relative Häufigkeit von natürlichen Zinnisotopen

Masse [amu]	Relative Häufigkeit [%]
112	0.97
114	0.65
115	0.36
116	14.53
117	7.68
118	24.22
119	8.58
120	32.59
122	4.63
124	5.79

(Dunemann *et al.*, 1995)

Zinnorganische Verbindungen leiten sich meist vom vierwertigen Sn ab und sind im Gegensatz zu ihren anorganischen Sn-Verbindungen relativ toxisch. In der Liste prioritärer Stoffe der EU-Wasserrahmenrichtlinie sind sie als prioritär gefährlich eingestuft (Böhm *et al.*, 2002). Dabei kann man sagen, dass die Toxizität mit kürzerer Kettenlänge der Alkylgruppen und mit höherem Alkylierungsgrad zunimmt.

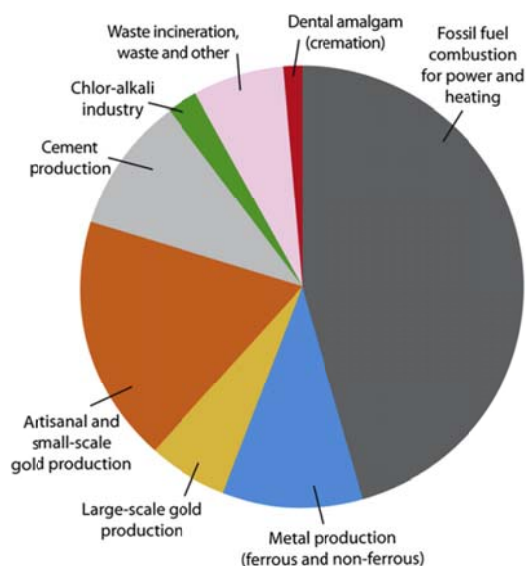
Mit Ausnahme von Methylzinnverbindungen, welche durch Biomethylierung entstehen können, sind Organozinnverbindungen generell anthropogenen Ursprungs (Fent, 1996). Verwendung finden Organozinnverbindungen in verschiedenen Bereichen als Ausgangsprodukte für die Synthese, in Antifoulingfarben, in Agrarchemikalien (als Fungizide, Insektizide, Fraßhemmer), in Bioziden und Desinfektionsmitteln oder als Wurmmittel für Geflügel, um nur einige zu nennen (Lohmann, 2006). Dies legt den Verdacht nahe, dass Methylzinnverbindungen auch in Biogasanlagen gebildet und nachgewiesen werden können (siehe spezieller Teil, Kapitel 1, Seite 63).

2.5 Quecksilber und methylierte Verbindungen

Auf der Erde kommt Quecksilber (Hg) zumeist in Form von Quecksilbersulfid (HgS , Zinnober) vor, welches schon in der Antike in großem Umfang als Pigment verwendet wurde. Man findet es aber auch in elementarer Form in Einschlüssen von Gesteinen. Die angelsächsische Bezeichnung „mercury“ geht wegen der Beweglichkeit dieses Metalls auf den römischen Götterboten Merkur zurück. Das Symbol Hg leitet sich wiederum vom lateinischen „hydrargyrum“, flüssiges Silber ab (Greenwood *et al.*, 1990). Die Darstellung von elementarem Quecksilber ist einfach und erfolgt durch Rösten des Erzes im Luftstrom.

Mit Sauerstoff bildet Quecksilber oberhalb von 350°C Quecksilberoxid (HgO). Ab 400°C zerfällt dieses HgO wieder in Sauerstoff und Quecksilber (Latscha *et al.*, 2007), was man sich auch bei einigen Analysengeräten (siehe Kapitel 3.1, Seite 38) zu Nutze macht.

Als natürliche Quecksilberquellen gelten vor allem Vulkane und geothermale Quellen. Aber auch durch anthropogene Quellen (Abbildung 7) gelangen jährlich



(Pacyna *et al.*, 2010)

Abbildung 7: Verteilung der globalen Quecksilberemissionen (Stand 2005).

etwa 2000 Tonnen Hg in die Atmosphäre (Pacyna *et al.*, 2010). Mehr als ein Drittel davon durch die Verbrennung fossiler Brennstoffe wie Erdöl oder Erdgas in dem es neben elementarem Quecksilber auch in Form des hochgiftigen Dimethylquecksilbers nachweisbar ist (Hippler *et al.*, 2004). Auch die Emissionen aus der Gold- und Metallproduktion (Goldwäsche) tragen erheblich zum Hg Eintrag in die Atmosphäre bei. Neben fossi-

len Brennstoffen werden zunehmend Ersatzbrennstoffe zur Energieerzeugung eingesetzt (Müllverbrennung). Auch hier können, gerade bei unzureichender vorheriger Sortierung der Abfälle, große Mengen an Quecksilber freigesetzt werden. Über den Einfluss unterschiedlicher Liganden und die Bildung verschiedener Spezies in der Abgasreinigung liegen gerade erste Erkenntnisse vor (Bittig, 2011).

Die in die Natur eingebrachten Quecksilberverbindungen werden durch diverse Reduktions- und Oxidations- sowie Metabolisierungsprozesse (Methylierungen bzw. Demethylierungen) in unterschiedliche Spezies überführt. Aus der unterschiedlichen Mobilität und ständigen Umwandlung der einzelnen Spezies resultiert ein globaler Quecksilberkreislauf für den in der Literatur, welche hier nicht im Einzelnen aufgeführt werden soll, zahlreiche Varianten vorgeschlagen wurden. Abbildung 8 zeigt eine vereinfachte Zusammenfassung dieser Modelle und gibt so einen kurzen Überblick über diesen Kreislauf.

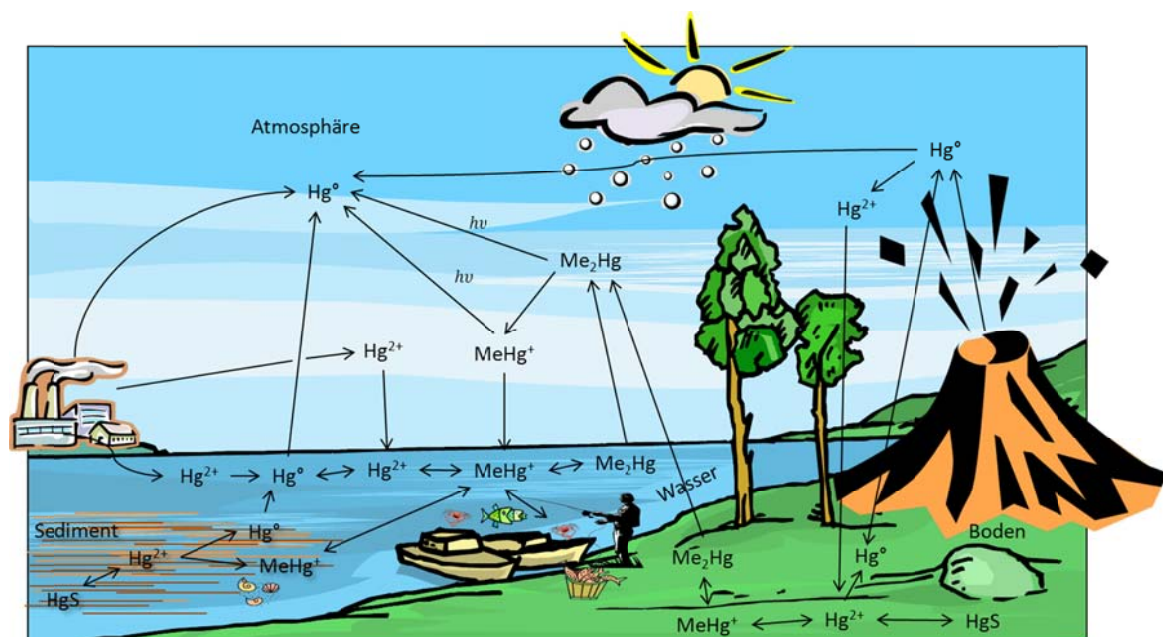


Abbildung 8: Globaler Quecksilberkreislauf

Als Alternative zu herkömmlichen Energien werden neben Wind- und Solar-
kraftanlagen immer mehr Biogasanlagen aufgebaut. Wie und in welcher Form
(Spezies) dort Quecksilber (und andere leichtflüchtige metall(oid)organische

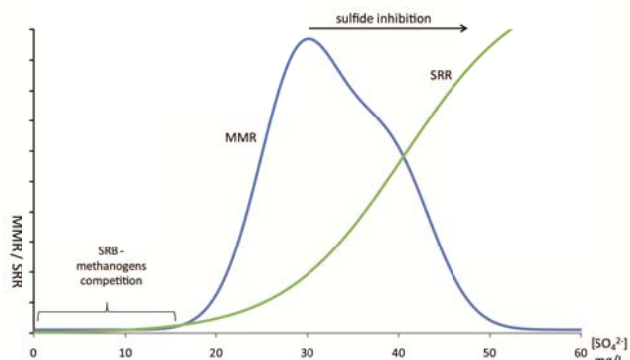
Verbindungen) emittiert werden ist kaum bekannt und soll im Rahmen dieser Arbeit in Kapitel 1, spezieller Teil ab Seite 63, untersucht werden.

Zur Energieeinsparung werden laut EG-Verordnung europaweit konventionelle Glühlampen zugunsten von Energiesparlampen abgeschafft (EG-Verordnung 244/2009). Diese enthalten allerdings, je nach Literatur, 1,5 bis 2 mg (Umweltbundesamt, 2011) bis hin zu 6 mg Quecksilber (Ökotest, Oktober 2008) und müssen daher gesammelt und fachgerecht entsorgt werden. Wobei man davon ausgehen kann, dass ca. 80% der gebrauchten Leuchtmittel im Hausmüll landen, der Leuchtkörper zerstört und das flüchtige Hg entweichen kann (Walch *et al.*, 2009). Aber auch bei der Entsorgung werden die Arbeiter der Entsorgungsunternehmen dem Quecksilber ausgesetzt, was sich mit einer Methode zur Quecksilber-Speziesbestimmung im Vollblut nachweisen lässt (Hippler *et al.*, 2009b). In wieweit die hier nachgewiesenen Quecksilber- und Methylquecksilberkonzentrationen mit den einzelnen Arbeitsplatzbereichen korrelieren, bleibt Aufgabe der Arbeitsmedizin und soll gesondert publiziert werden (Eitschberger *et al.*, in Vorbereitung).

Auch Quecksilber bildet, wie zuvor bereits für andere Metalle beschrieben, im Organismus Komplexe mit Schwefelgruppen bzw. Schwefelgruppen beinhaltenen Molekülen wie Cystein, welche so aufgrund von „molekular Mimikry“ leicht aufgenommen werden können (Bridges *et al.*, 2006).

Die Biomethylierung des Hg(II)chlorids zu Methylquecksilber in vivo konnte unter anderem anhand von Pilzkulturen (Fischer *et al.*, 1995) sowie durch Makroalgen in Seewasser (Pongratz *et al.*, 1998) gezeigt werden. Besonders die Bildung von Quecksilbercystein in Fischen (Harris *et al.*, 2003) als biologisch aktive Substanz zeigt die Bedeutung kleiner „Biomoleküle“ für den Transportprozess in Tieren auf. Besonders hohe Methylquecksilbergehalte wurden in Tieren nachgewiesen, deren Nahrung bevorzugt aus Wasserorganismen besteht, wie beispielsweise in Alligatoren, dem Florida Panther und Fischen (Cleckner *et al.*, 1998). Auch kann eine stetige Zunahme der Konzentration von Methylquecksilber in der Biomasse der nördlichen Everglades in Florida, USA, beobachtet wer-

den. Die Methylierung des Quecksilbers tritt bevorzugt in Sedimentnähe auf (Krabbenhof *et al.*, 2000), wobei sowohl sulfatreduzierende Bakterien als auch die Sulfat-Geochemie eine wichtige Rolle spielen. Während im Bereich kleiner Sulfatkonzentrationen eine Erhöhung dieser Konzentration sowohl einen Anstieg der Sulfat-Reduzierungs- (SRR) als auch der Quecksilber-Methylierungsrate (Mercury methylation rate, MMR) mit sich bringt, verhindert ein weiterer Anstieg der SSR eine weitere Bildung von methylierten Quecksilberspezies und verringert so die MMR (Abbildung 9). Bei geringen Sulfidkonzentrationen können die neutralen Quecksilberverbindungen durch sulfatreduzierende Bakterien (SRB) aufgenommen werden. Sind hingegen hohe Sulfidkonzentrationen vorhanden, so



(Hirner und Hippler, 2011)

Abbildung 9: Quecksilber-Methylierungsrate (Mercury methylation rate, MMR) als Funktion der Sulfatverfügbarkeit.

bilden sich Charge-Transfer-Komplexe bzw. weitere Schwefelverbindungen, welche dann wesentlich weniger bioverfügbar sind und sich somit auch die Biomethylierung verringert (Hirner und Hippler, 2011).

Neben der Verfügbarkeit des Sulfates scheint eine erhöhte Produktion von MeHg aber auch mit einem geringen pH-Wert, einem geringen Salzgehalt und der Anwesenheit von zersetzbarem organischem Material einher zu gehen (Ullrich *et al.*, 2001).

Allerdings ist es eher unwahrscheinlich, dass Quecksilber und speziell Methylquecksilber als freie Kationen in biologischen Systemen existieren. Vermutlich sind auch diese an Schwefel beinhaltende Biomoleküle gebunden. Dies ist aber selbst mit den derzeit gebräuchlichen, „weichen“ Extraktions- und Aufschlussmethoden nicht nachzuweisen. Krupp *et al.* entwickelten daher eine Methode

zur Identifizierung von biologischen Quecksilber-Schwefel-Verbindungen (Cystein- und Glutathionkomplexe) in Pflanzen unter Verwendung einer simultanen HPLC - ES-MS / ICP-MS Kopplung (Krupp *et al.*, 2008).

3. Analytik metall(oid)organischer Verbindungen

Dieser Abschnitt soll in kurzer Form allgemeine Methoden zur Speziesanalytik beschreiben, bevor anschließend auf einzelne Verfahren weiter eingegangen wird.

Der analytische Nachweis von Arsen gelang im Jahre 1837 mit der vom englischen Chemiker James Marsh entwickelten Methode (Marsh'sche Probe), bei der das Arsen durch naszierenden Wasserstoff zu gasförmigem Arsenwasserstoff reduziert und anschließend als schwarzer Arsenspiegel nachgewiesen werden kann (Marsh, 1837).

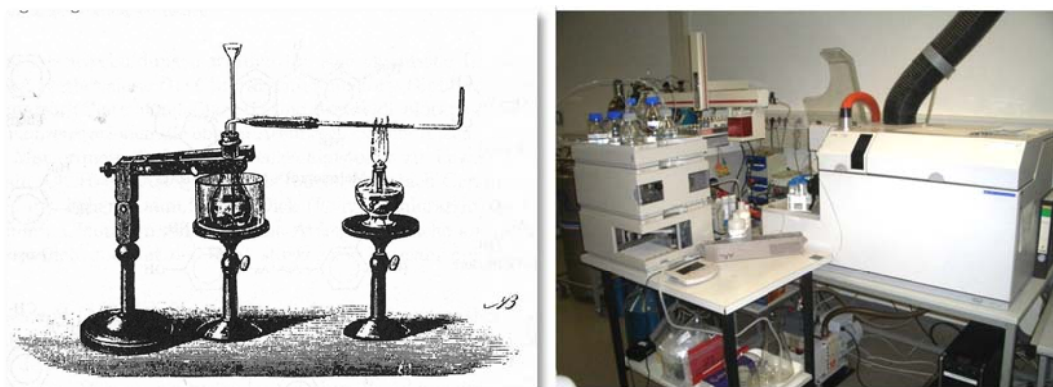


Abbildung 10: Analytischer Nachweis von Arsen aus dem Jahre 1837 (links, Marsh'sche Probe) und Arsenspeziesbestimmung heute mittels HPLC/ICP-MS (rechts).

Heute ist der apparative Aufwand erheblich größer (Abbildung 10) und erstreckt sich nicht nur auf den reinen Nachweis von Arsen, sondern beinhaltet auch die Bestimmung einzelner Metall(oid)spezies. Üblicherweise wird hierzu eine Kopplung von High Performance Liquid Chromatography (HPLC) mit Hydridgenerierung-Atomabsorptionsspektroskopie (HG-AAS) oder, aufgrund der besseren Empfindlichkeit, mit der Atomfluoreszenzspektroskopie (HG-AFS) eingesetzt. Weit verbreitet ist mittlerweile auch die Verwendung eines induktiv gekoppeltem Plasma Massenspektrometers (engl. Inductively Coupled Plasma / Mass Spectrometry, ICP-MS). Diese Kopplung zeichnet sich durch ihre hohe Sensitivität, dem weiten dynamischen Bereich sowie der einfachen Kopplung an die

HPLC (Wegfall der Hydridgenerierung) aus. Shimoda *et al.* konnten zeigen, dass zum Nachweis von Arsenozuckern in Seegras eine HPLC-MS/MS Kopplung sensibler sein kann, als die entsprechende HPLC/ICP-MS Kopplung. Da aber anorganisches Arsen mittels HPLC-MS/MS nicht nachweisbar ist, ist zur akkuraten Speziesbestimmung dann eine Kombination aus HPLC-MS/MS und HPLC-ICP-MS notwendig (Shimoda *et al.*, 2010).

Zudem stehen weitere Kopplungstechniken zur Verfügung, wie die von Kösters *et al.* entwickelte und bereits oben beschriebene parallele GC-MS/ICP-MS. Allgemein ist zur Speziesbestimmung immer eine chromatographische Trennung (flüssig oder gasförmig) oder Gelelektrophorese in Kombination mit einem sensiblen Detektor notwendig. Besonders wichtig ist die Chromatographie wenn sich die physikochemischen Eigenschaften der zu trennenden Analyten sehr ähnlich werden, wie es bei vielen permethylierten metall(oid)organischen Verbindungen der Fall ist. Aufgrund der guten Trennleistung und der erreichbaren geringen Nachweisgrenzen sollte dann auf gaschromatographische Methoden gesetzt werden; nicht zuletzt wegen der Abwesenheit der mobilen Phase (Szpunar *et al.*, 2004). Hier zeigt sich auch ein weiterer Vorteil des ICP-MS, welches eine Multielementanalyse ermöglicht und so auch bei gleicher Retentionszeit zwischen verschiedenen Metall(oid)en unterscheiden kann (vgl. allgemeiner Teil, Kapitel 3.2, Seite 40). Für nicht flüchtige Spezies bietet dennoch die Flüssigchromatographie oder die Gelelektrophorese eine gute Alternative, wobei zu beachten ist, dass viele Spezies mittels Derivatisierung (Hydrierung, Ethylierung oder Propylierung) in die Gasphase überführt werden können (vgl. allgemeiner Teil, Kapitel 3.3, Seite 103). Ein schematischer Überblick über die Kopplungsmöglichkeiten ist in der folgenden Abbildung 11 gegeben.

Auf einige der in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Kopplungs- und Derivatisierungstechniken soll in den folgenden Abschnitten weiter eingegangen werden.

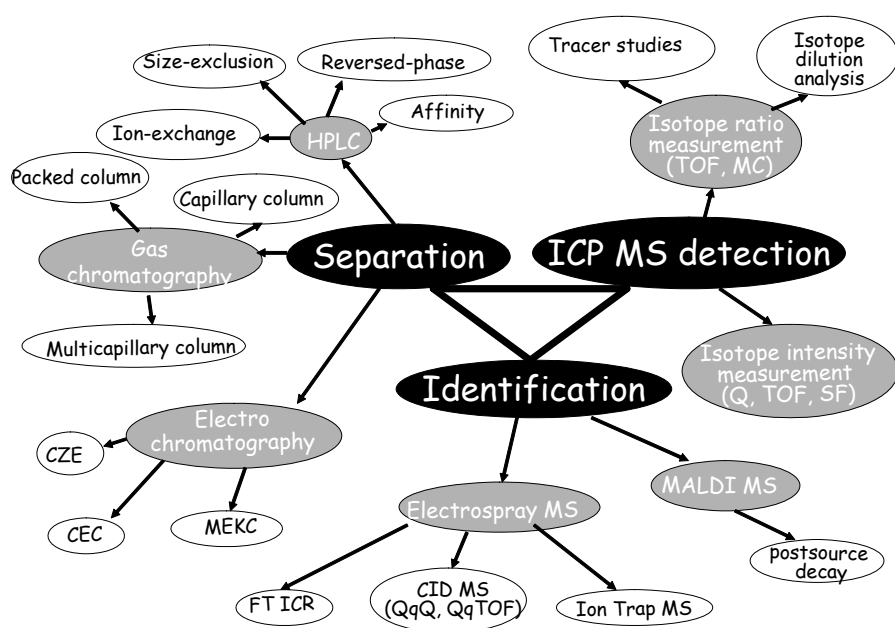
(Styblo *et al.*, 1999)

Abbildung 11: Schematischer Überblick über die Kopplungsmöglichkeiten verschiedener analytischer Systeme zur Speziesanalytik

3.1 Gesamtquecksilber-Analysator

Oftmals wird zur Bestimmung von Quecksilber die Kaltdampftechnik in Kombination mit der Atomabsorptions- (AAS) bzw. Atomfluoreszenzspektroskopie (AFS) eingesetzt. Zudem gibt es mit dem „Gesamtquecksilber-Analysator“ ein weiteres System, welches nahezu matrixunabhängig und ohne Probenvorbereitung zur direkten Hg-Messung für feste, flüssige und gasförmige Proben eingesetzt werden kann. Die eingewogenen Proben werden hier zunächst im Sauerstoffstrom bei 1000°C zersetzt. Auf diese Weise werden aufwendige und mit Störungen behaftete chemische Aufschlussverfahren als Probenvorbereitung hinfällig. Wie in Kapitel 2.5 (Seite 31) beschrieben, zerfällt das sonst bei der Verbrennung gebildete Quecksilberoxid oberhalb von 400°C wieder in Sauerstoff und Quecksilber. Das so freigesetzte Hg und die dabei entstehenden Pyrolysegase

passieren anschließend einen Verbrennungskatalysator. In diesem werden alle störenden Nebenprodukte der Veraschung abgetrennt oder zurückgehalten. Restliche Verbrennungsgase entweichen durch die Messkammer in die Abluft. Freigesetztes Hg wird an einem Amalgamkollektor (Goldfalle) gebunden. Anschließend wird das gesammelte Quecksilber durch Ausheizen des Amalgamators atomisiert und in eine mehrzellige Messküvetteneinheit überführt. Die Messung wird mittels eines eingebauten Atomabsorptions-Spektrometers in einem Messbereich von etwa 0,01 bis 1000 ng Hg vorgenommen. Die Funktionsweise des Gerätes ist in Abbildung 12 schematisch dargestellt. Auf die Grundlagen der AAS soll hier nicht weiter eingegangen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Gerät zur ges. Quecksilberbestimmung in Biogasanlagen eingesetzt.

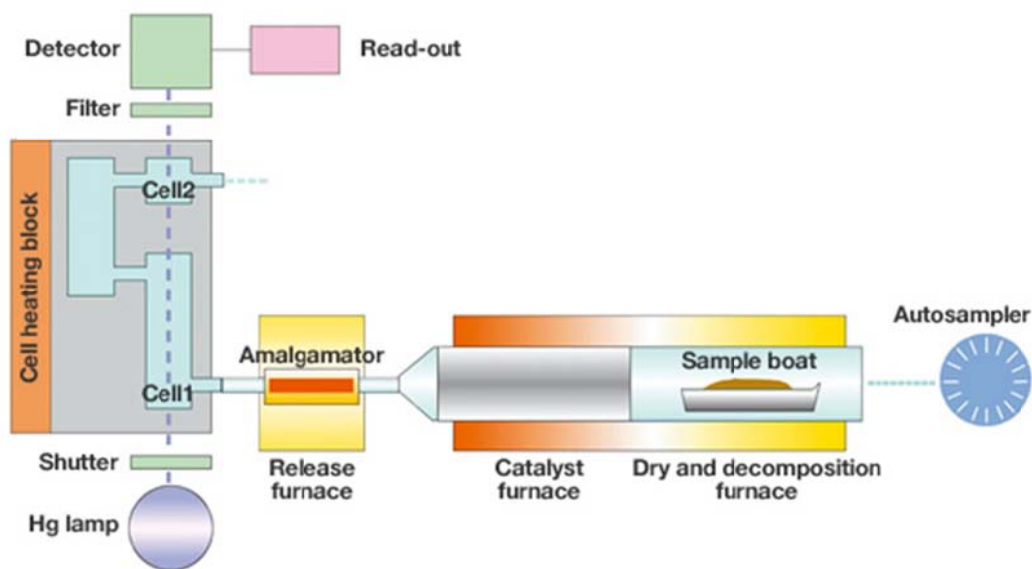


Abbildung 12: Schematische Darstellung des „Direct Mercury Analyzers“ (DMA-80). Bildquelle: Milestone S.r.l., Sorisole, Italy.

3.2 Induktiv gekoppeltes Plasma Massenspektrometer (ICP-MS)

Die Massenspektrometrie mit einem induktiv gekoppeltem Plasma Massenspektrometer (ICP-MS, Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry) ermöglicht eine Multielementanalyse bei hoher Sensitivität und gleichzeitigem hohen Probandendurchsatz; sie wird unter anderem zur Spurenanalyse von Schwermetallen wie Quecksilber, Blei oder Cadmium benutzt. Mittels eines ICP-MS können die meisten Elemente des Periodensystems bis hinunter in den Nanogramm-pro-Liter (ng/l) Bereich bestimmt werden. Der Aufbau eines ICP-MS ist in Abbildung 13, am Beispiel eines Agilent 7500a ICP-MS, schematisch dargestellt. Durch Kopplung mit analytischen Trennmethoden wie HPLC, Gaschromatographie, Kapillarelektrophorese oder Ionenaustauschchromatographie lässt sich das ICP-MS auch zur Speziationsanalyse verwenden (Kapitel 3.3, Seite 44) und wird so in der Analytik zu einem universell einsetzbarem Analysegerät (Ammann, 2007).

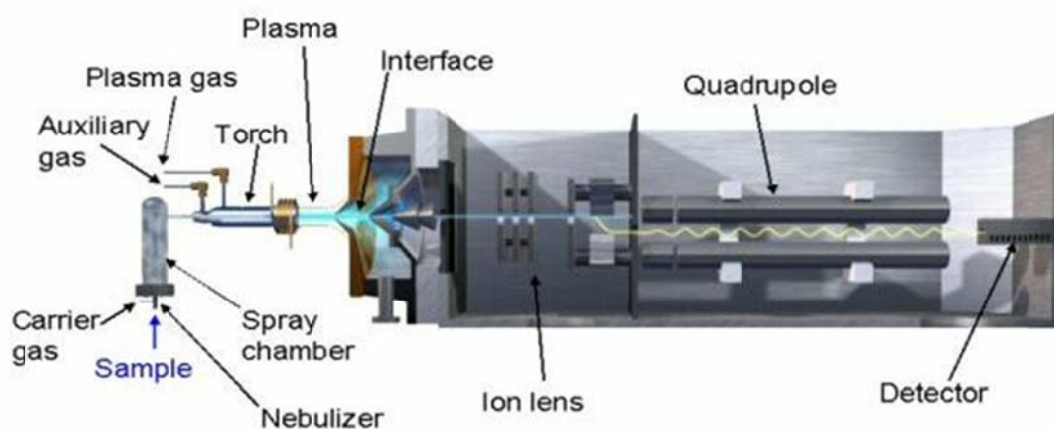


Abbildung 13: Schematischer Aufbau eines induktiv gekoppelten Plasma Massenspektrometers (ICP-MS; Agilent 7500a). Bildquelle: Agilent Technologies, Waldbronn, Germany.

Auf detaillierte Beschreibungen einzelner Komponenten soll hier nur kurz eingegangen werden. Für eine detaillierte Beschreibung sei auf gängige Fachbücher wie z.B. „Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications“ (Becker, 2007) verwiesen.

Probeneinführung

Generell werden flüssige Proben dem Zerstäuber (engl. Nebulizer) des ICP-MS mittels einer peristaltischen Pumpe oder direkt über die HPLC zugeführt. Der Zerstäuber ist in verschiedenen Bauformen erhältlich und sorgt für die Bildung eines feinen Aerosols (Thomas, 2001 a). Nachteilig ist ein Verlust von bis zu ca. 99 % der Probenlösung sowie die mögliche Signalverringernug in Gegenwart von Säuren (Maestre *et al.*, 1999). Anstelle einer HPLC kann die Kopplung des ICP-MS auch mit einem Gaschromatographen erfolgen (vgl. allgemeiner Teil, Kapitel 3.3, Seite 44). Der Zerstäuber wird dann nur noch zur Zuführung eines internen Standards verwendet.

Plasma als Ionisationsquelle

Zur Erzeugung des Plasmas wird Argon (Ar) durch eine Reihe konzentrisch angeordneter Quarzröhren geleitet, die die Plasmafackel (engl. Torch) bilden. Durch die innerste Röhre (Injektorrohr) gelangt das Proben-Aerosol in das

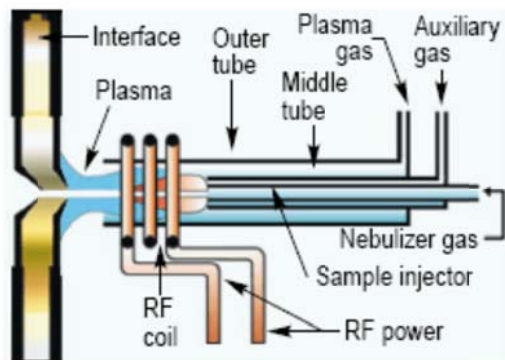


Abbildung 14: Aufbau und Gasflüsse der Plasmafackel mit Induktionsspule und Interface (Thomas, 2001 b).

Plasma. Die mittlere sowie die äußere Röhre werden mit Plasma- bzw. Hilfs-gas durchströmt. Der vordere Teil der Torch ist in der Mitte der gas- oder wassergekühlten Induktionsspule positioniert (Abbildung 14), die für ein hochfrequentes elektromagnetisches Feld (27,1 bzw. 40,6 MHz) sorgt (Thomas, 2001 b). Die Induktion des hochfrequenten Wechselstromes in

das durch die Plasmafackel strömende Argon bewirkt eine Kollision der Argon-atome, durch die letztendlich das Plasma erzeugt wird. Dieses besteht überwiegend aus Argonionen (Ar^+) sowie Elektronen. Bei einer hohen Temperatur des Plasmas von etwa 6000 bis 10000 K wird das Probenaerosol (die Probenmoleküle) durch Stoßreaktionen atomisiert und ionisiert (Hill *et al.*, 2006).

Massenspektrum und Interferenzen

Das mittels Quadrupol-ICP-MS generierte Massenspektrum ist recht einfach: Jedes Element-Isotop erscheint bei einer anderen Masse (z.B. wird ^{75}As daher mit 75 amu detektiert) mit einer Peakintensität, die der anfänglichen Konzentration der Isotope proportional ist (Thomas, 2002).

Allerdings ist auch die Analyse mittels ICP-MS nicht störungsfrei und es kann eine Vielzahl spezifischer Interferenzen auftreten. Isobare Interferenzen werden durch Isotope verschiedener Elemente mit gleicher Masse hervorgerufen. Beispielsweise seien hier die Elemente ^{40}Ar und ^{40}Ca sowie ^{104}Pd und ^{104}Ru genannt. Während man im Falle derartiger Interferenzen auf ein anderes Isotop desselben Elementes ausweicht, ist dies bei monoisotopischen Elementen wie Arsen oder Bismut nicht möglich. Weiterhin ergeben sich Interferenzen, die durch die Bildung polyatomarer Molekülionen hervorgerufen werden (May *et al.*, 1998). Polyatomare Molekülioneninterferenzen entstehen im Ar-Plasma, da durch die dort herrschenden hohen Temperaturen (bis zu 10000 K) fast alle ins Plasma eingebrachten Elemente ionisiert werden und metastabile Verbindungen bilden können, die unter Normalbedingungen nicht entstehen würden. Eine Zusammenfassung der polyatomaren Interferenzen für einige in dieser Arbeit wichtige Isotope ist in Tabelle 4 gegeben.

ICP-MS Messungen sollten daher möglichst auf einem nicht interferierten Isotop durchgeführt werden. Polyatomare Molekülionen werden vor allem vom Plasmagas selbst in Form von Argondimeren, Argonhydriden, -nitriden, -chloriden, und Argonoxiden (Ar_2^+ , ArH^+ , Ar_2H^+ , ArN^+ , ArCl^+ und ArO^+) gebildet. Eine irrtümlich falsche Zuordnung eines Signals auf der Masse $m/z=75$ (As), hervorgerufen durch die Bildung von $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ als Interferenz-Ion, aufgrund einer hohen Chloridkonzentration in der zu untersuchenden Probe kann durch die gleichzeitige Messung der Masse $m/z=77$ ($^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$) weitgehend ausgeschlossen werden.

Tabelle 4: Ausgewählte, polyatomare Interferenzen im ICP-MS

Isobare Interferenzen							
^{75}As	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$	^{121}Sb	$^{105}\text{Pd}^{16}\text{O}^+$	^{202}Hg	$^{184}\text{W}^{16}\text{O}^+$	^{209}Bi	$^{193}\text{Ir}^{16}\text{O}^+$
	$^{59}\text{Co}^{16}\text{O}^+$		$^{89}\text{Y}^{16}\text{O}_2^+$	^{202}Hg	$^{186}\text{W}^{16}\text{O}^+$		
	$^{36}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^1\text{H}^+$		$^{40}\text{Ar}^{81}\text{Br}^+$				
	$^{38}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$						
	$^{36}\text{Ar}^{39}\text{K}$						
	$^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}_2$						
	$^{23}\text{Na}^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}$						
	$^{12}\text{C}^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^+$						

Arsen selbst wird nur zu etwa 50% im Plasma ionisiert. Im Gegensatz zum Arsen treten bei Antimon, Bismut und Zinn nur sehr wenige Interferenzen auf. Für Zinn seien hier MoO^+ sowie Th^{2+} und U^{2+} Ionen einiger Isotope genannt. Die Ionisierung beträgt für alle drei genannten Elemente mehr als 90% weshalb sie für eine ICP-MS Analytik gut geeignet sind. Zudem besitzt Antimon zwei, Zinn viele weitere natürlich vorkommende Isotope (vgl. allgemeiner Teil, Kapitel 2.4, Seite 30) auf denen gemessen werden kann.

Quecksilber hat ein sehr hohes erstes Ionisierungspotential (10,44eV). Dies hat zur Folge, dass nur etwa 4% des eingetragenen Hg im Plasma ionisiert und später detektiert werden. Zudem hat Quecksilber, wie oben beschrieben, viele natürlich vorkommende Isotope mit einem jeweiligen Anteil von weniger als 30%. Beide Faktoren führen zu einer relativ geringen Sensitivität des ICP-MS für Quecksilber. Daraus folgt, dass das Plasma bei hohen Temperaturen betrieben werden sollte um eine möglichst hohe Ionisierung zu erreichen. Zur Vermeidung der Oxidbildung sollte dabei allerdings das CeO^+/Ce^+ Verhältnis so gering wie möglich gehalten werden.

3.3 Chromatographie

Generell kann man zwischen Gas- und Flüssigkeitschromatographie unterscheiden. Die Systeme können als bekannt vorausgesetzt werden und sollen daher nur kurz unter Anbetracht der verwendeten Säulen und ICP-MS Kopplung beschrieben werden.

Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Ein HPLC-System besteht prinzipiell aus verschiedenen, einzelnen Komponenten wie Hochdruckpumpe(n), Pulsdämpfer, Autosampler, Trennsäule, Säulenofen und Detektor. Die einzelnen Komponenten werden als bekannt vorausgesetzt und sollen unter Verweis auf gängige Lehrbücher (Meyer, 2004) hier nicht weiter behandelt werden. Typische HPLC-Systeme arbeiten mit einem Fluss von etwa 1 ml/min und Arbeitsdrücken bis 300 bar. Die Geräteparameter der in dieser Arbeit eingesetzten HPLC sind im jeweiligen Geräte- / Methodenteil aufgeführt.

HPLC-Säulen

Je nach Art der zu trennenden Verbindung werden verschiedene Trennphasen benötigt um beispielsweise Proteine, ionische, polare, chirale, organische oder anorganische Verbindungen trennen zu können. In der HPLC gibt es daher eine fast unüberschaubare Auswahl an Füll- bzw. Säulenmaterialien (mehr als 700). Die Eigenschaften der verschiedenen stationären Phasen hängen im Wesentlichen von physiko-chemischen und chemischen Eigenschaften ab. Wichtige Einflussfaktoren sind dabei die Partikel- und Porengröße, die Struktur der Oberfläche sowie die Art der funktionellen Gruppe.

So kann zur Trennung von großen Biomolekülen die Größenausschlusschromatographie (SEC, Size Exclusion Chromatographie) verwendet werden. Sie trennt die Substanzen nach ihrem hydrodynamischen Querschnitt.

Die Ionenaustauschchromatographie (IEX, Ion Exchange Chromatography) lässt sich in die Anionenaustausch- (AEC) und die Kationenaustauschchromatographie (CEC) unterteilen. Eine viel verwendete, typische Anionenaustauscher-Säule ist beispielsweise die PRP-X100 (Hamilton, Bonaduz, Schweiz), welche sowohl für die Trennung von anorganischen als auch organischen Anionen eingesetzt werden kann (z.B. bei der Arsen-Speziierung).

Die am häufigsten verwendeten stationären Phasen sind derivatisierte Kieselgelphasen mit Alkylketten, z.B. C8- oder C18-Ketten (Meyer, 2004). In der RP-Chromatographie ist die stationäre Phase grundsätzlich unpolarer als die mobile Phase. Gerade C18-Phasen zeichnen sich vor allem durch ihren stark hydrophoben Charakter aus. Neben den Alkylketten können aber auch Silanol-Gruppen mit den Analyten in Wechselwirkung treten, da aus sterischen Gründen nicht alle Hydroxylgruppen der Kieselgeloberfläche mit Alkylketten zur Reaktion gebracht werden können (Dekker, 1990). Zur Deaktivierung der Silanol-Gruppen wird das Säulenmaterial mit Trimethylchlorsilan nachbehandelt (Endcapping). Obwohl C18-Säulen aus dem gleichen Material bestehen, können sie, abhängig von Porengröße, Länge, Durchmesser und nicht zuletzt der Qualität des Säulenmaterials, unterschiedliche Trennverhalten aufweisen. Neben Octadecylresten (C18) können Silicagele auch mit Butyl-, Octyl- (C4, C8), Phenyl-, Cyano- oder Aminogruppen modifiziert sein.

Die chromatographische Trennung ist stark vom pH-Wert des Laufmittels abhängig, was sich gut an den einzelnen Arsenspezies verdeutlichen lässt. Bei einem neutralen pH-Wert liegen sowohl As(V) als auch MMA(V) und DMA(V) als Anionen vor ($pK_a=2,3; 3,6; 6,2$). Trimethylarsenoxid (TMAO(V), $pK_a=3,6$) und Tetramethylarsen (TeMA(V)) liegen hingegen als Kationen, Arsenobetain (As-Bet, $pK_a=2,18$) als Zwitterion und As(III) als ungeladene Spezies vor ($pK_a=9,3$) (Leermakers *et al.*, 2006). Dies zeigt, dass zur Trennung dieser Spezies sowohl eine Anionenaustauscher-Säule, zur Trennung von As(V), As(III), MMA(V) und DMA(V), als auch eine Kationenaustauscher-Säule zur Trennung von As-Bet, TMAO und TeMA verwendet werden können. Aber auch die Verwendung der

zuvor beschriebenen „reversed-phase“ Säulen mit einem entsprechenden Gegenion in der mobilen Phase ist durchaus möglich (siehe spezieller Teil, Kapitel 4.2.2, Seite 192).

Gaschromatographie (GC) und ICP-MS Kopplung

Auf die Grundlagen der Gaschromatographie soll hier ebenfalls nicht im Einzelnen eingegangen werden, da auch diese in gängigen Lehrbüchern hinreichend beschrieben werden (Schwedt, 2008). Vielmehr sollen hier die in dieser Arbeit eingesetzten Methoden und Kopplungen beschrieben werden.

Leichtflüchtige metall(oid)organische Verbindungen wie z.B. Trimethylarsen (Me_3As), Dimethylquecksilber (Me_2Hg) oder Tetramethylzinn (Me_4Sn) lassen sich gaschromatographisch recht gut, ohne vorhergehende Derivatisierung, auf einer unpolaren oder leicht polaren Säule analysieren.

Zur Analyse dieser Verbindungen in Gasproben (z.B. der Biogasproben im speziellen Teil, Kapitel 1, Seite 63) werden, abhängig von der zu untersuchenden Probe, etwa 1 bis 10 Liter des zu untersuchenden Gases über eine gepackte und gekühlte Säule („cryp-trap“, -120 bis -80°C) geleitet. Dabei werden die metall(oid)organischen Verbindungen ausgefroren (getrappt) und so von der Matrix (z.B. Methan, Großteile des CO_2) getrennt. Aufgrund der hohen Flussraten werden hier vorwiegend gepackte Säulen eingesetzt; aber auch die Verwendung von Kapillarsäulen für geringere Flussraten ist möglich (Ilgen *et al.*, 2010). Die Detektion der einzelnen Spezies erfolgt durch Kopplung der GC-Säule an ein ICP-MS. Ist nur die Detektion von Quecksilber oder Arsen vorgesehen, so kann als kostengünstige Alternative zum ICP-MS auch ein AFS verwendet werden (Hippler *et al.*, 2004). Die Kopplung mit dem ICP-MS ermöglicht hingegen eine simultane Speziierung verschiedener Elemente wie Antimon, Arsen, Bismut, Quecksilber, Zinn, usw. mit Nachweisgrenzen im pg-Bereich.

Feldmann *et al.* haben gezeigt, dass die Zuordnung unbekannter metall(oid)organischer Spezies mittels einer Siedepunkt-Retentionszeit-Korrelation

erfolgen (Feldmann *et al.*, 1995) kann. Allerdings zeigt das Beispiel der Bestimmung dreiwertiger methylierter Arsenverbindungen in Urinproben, dass Speziesidentifikationen alleine auf Grundlage von Retentionszeitvergleichen aus analytischer Sicht auch unzureichend sein können. So wurden z.B. als Referenzverbindung fälschlicherweise eine As-S-Spezies synthetisiert und auf Realproben angewendet, obwohl die vermeintlichen Analyten keinen Schwefel enthielten (Hirner, 2006). Spätestens hier wurde klar, dass zur einwandfreien Identifikation des Analyten nach dem chromatographischen Trennschritt neben dem für Konzentrationsbestimmungen sehr geeigneten ICP-MS gleichzeitig ein strukturempfindlicher Detektor eingesetzt werden sollte. Geeignet ist hier die von Kösters und Hippler entwickelte und in Abbildung 15 dargestellte Kopplung zwischen GC und ICP-MS bzw. EI-MS (GC-EI-MS/ICP-MS) (Kösters *et al.* 2005, 2003). Dieser Aufbau ermöglicht eine gleichzeitige struktur- und elementspezifische Bestimmung an ein und derselben Probe.

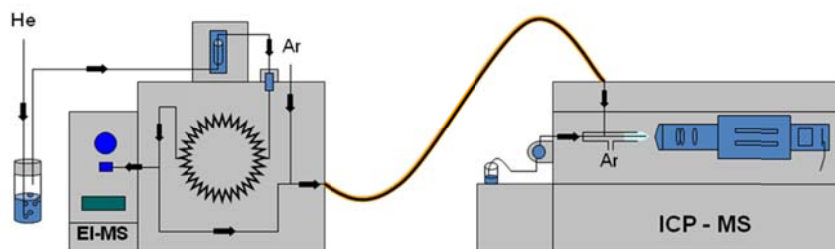


Abbildung 15: Parallele Kopplung von ICP-MS und EI-MS nach gaschromatographischer Trennung

Derivatisierung / Hydrierung

Da die Bindungsformen, in der die metall- und metall(oid)organischen Verbindungen in vielen Proben, mit Ausnahme der Gasproben vorliegen, nicht direkt zugänglich sind, müssen viele Analyten zunächst derivatisiert werden um sie in ihre korrespondierenden flüchtigen Derivate zu überführen, welche im Anschluss der GC-Analyse zugeführt werden können. So ist es möglich auch teilmethylierte Spezies analytisch (gaschromatographisch) zu erfassen.

Die Hydridgenerierung hat sich längst zu einem Standardverfahren für die Analyse von hydridbildenden Elementen (siehe allgemeiner Teil, Kapitel 1), zu denen Arsen, Antimon, Bismut, Quecksilber, Germanium, Blei, Selen, Tellur und Zinn gehören, etabliert. Ein wesentlicher Vorteil der Methode liegt in der Möglichkeit der Volatilisierung flüchtiger Hydride, da durch Separation von der Probenmatrix und anschließender Aufkonzentration der Analyten in einer gekühlten Sammelfalle (Trapp, Kryofokussierung) eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit um mehrere Größenordnungen erreicht werden kann. Durch gaschromatographische Trennung können unterschiedlich alkylierte Spezies wiederum differenziert werden. Spezies mit unterschiedlichen Oxidationsstufen können dabei allerdings dieselben Hydride bilden.

Obwohl diese Derivatisierungstechnik sehr gute Nachweisempfindlichkeiten ermöglicht, sind einige Artefakte wie Transalkylierungseffekte bei $\text{pH} < 2$ oder Reagentienblindwerte bekannt, die im Einzelfall spezifisch untersucht und gegebenenfalls optimiert werden müssen (Grüter *et al.*, 2001). Mit dem Wissen um die Transalkylierungseffekte bei der Hydridgenerierung entwickelten Diaz-Bone *et al.* eine pH-Gradienten abhängige Derivatisierungsmethode, mit der die unterschiedlichen Derivatisierungseffizienzen bei unterschiedlichen pH-Werten vermieden werden können (Diaz-Bone *et al.*, 2008). Der Mechanismus der Bildung flüchtiger Hydride mittels Tetraethylborat wurde von D'Ulivo *et al.* eingehend beschrieben (D'Ulivo *et al.*, 2005).

Dennoch ist eine Hydrierung nicht unter allen Umständen und für alle Elemente zielführend. Als alternative Methode bietet sich hier beispielsweise die Ethylierung an. So konnte gezeigt werden, dass bei fachgerechter Anwendung der Ethylierung auch für als kritisch bekannte Analyten (Beispiel: Monomethylquecksilber) in komplexen Matrices (Beispiel: Humanblut) reproduzierbare und mit anderen Methoden (GC-MS mit deuterierten Standards) vergleichbare Resultate erhalten werden (Hippler *et al.*, 2009b). Aufgrund der einfachen Probenvorbereitung und hohen Nachweisstärke ist die Hydridtechnik ein weit verbreitetes Verfahren.

Wie bereits beschrieben unterscheidet die Hydrierung mit NaBH_4 aber nicht strikt zwischen penta- und trivalenten Antimon- und Arsenspezies (Dodd *et al.*, 1992). So werden erst bei pH-Werten ≤ 1 pentavalente Arsenspezies vollständig zu flüchtigen trivalenten Spezies reduziert. Bei pH-Werten > 5 kommt es nur noch zur Bildung flüchtiger Hydride der trivalenten Arsenspezies As(III) , MMA(III) und DMA(III) (Gong *et al.*, 2001).

Daher wurde in einigen hier durchgeführten Untersuchungen, gerade bei Arsenverbindungen, zusätzlich zur Hydridgenerierung eine HPLC-Methode / Kopplung verwendet.

4. Toxikologische Aspekte

In Kapitel 1 (ab Seite 9) wurde bereits auf die einzelnen Elemente (As, Sb, Bi, Hg und Sn) und deren metall(oid)organische Verbindungen in der Umwelt eingegangen. Dabei wurde auch auf einige toxikologische Aspekte, wie dem Challenger-Mechanismus und die Biomethylierung, hingewiesen. Anschließend sollen hier weitere toxikologisch relevante Punkte, insbesondere in Bezug auf Arsen, aufgegriffen und erweitert werden.

4.1 Metalle im menschlichen Körper

Die Gesamtanzahl der im menschlichen Körper vorhandenen Zellen wird auf etwa 10^{14} geschätzt. Der Gewichtsanteil der nichtmetallischen Elemente beträgt dabei über 98 %. Auf die Metalle Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium entfallen weitere 1,89 %; somit verbleiben für alle Spuren- und Schwermetalle lediglich 0,012% (Fuhrmann, 2006). Ein Überblick zur Metallbelastung des menschlichen Körpers ist in Tabelle 5 gegeben.

Tabelle 5: Metallbelastung des menschlichen Körpers. Zur Berechnung der Atome pro Zelle in Spalte 4 wurde eine idealisierte Verteilung auf alle 10^{14} Zellen angenommen.

Element	mg / 70kg Körpergewicht	$\mu\text{mol} / \text{kg}$	Atome $10^6 / \text{Zelle}$	Aus der Nahrung mg / Tag
Aluminium	100	53	22	36,4
Arsen	14	2,7	1,1	0,14
Blei	80	5,4	2,3	0,2-0,3
Cadmium	30	3,9	1,6	0,018-0,2
Quecksilber	4	0,3	0,12	0,005-0,02
Vanadium	20	5,6	2,4	2,5
Zinn	30	3,6	1,5	17

(Fuhrmann, 2006)

Die Toxizität vieler dieser Metalle kann damit erklärt werden, dass Zellen diese schnell aufnehmen können. Erstaunlicherweise ist nur wenig darüber bekannt, wie bestimmte Metall(oid)e und metall(oid)organische Verbindungen in Zellen gelangen können. Da es keine Transporter für diese Verbindungen gibt, muss hier eine andere Möglichkeit bestehen. Schwermetalle bilden eine Reihe stabiler Komplexe mit Liganden, die auch in lebenden Zellen vorkommen. Sie können dabei die Formen von physiologischen Kationen annehmen oder bilden Komplexe, die den Aminosäuren strukturell verwandt sind (Aschner *et al.*, 1988). So können sie die entsprechenden Transporter nutzen, um in das Zellinnere zu gelangen. Hier spielt also das sogenannte „molecular mimicry“ eine entscheidende Rolle. „Molecular mimicry“ beruht auf der Fähigkeit eines Metall(oid)-Ions an ein endogenes organisches Molekül zu binden und so ein metall(oid)organisches Molekül zu bilden, dass die Struktur eines funktionalen Moleküls besitzt und so dessen Transporter nutzen kann um in Zellen gelangen zu können (Bridges *et al.*, 2005). Ein typisches Beispiel für molekulares Mimikry ist das Methylquecksilbercystein (Me-Hg-S-Cys) und die entsprechende Aminosäure Methionin (Abbildung 16).

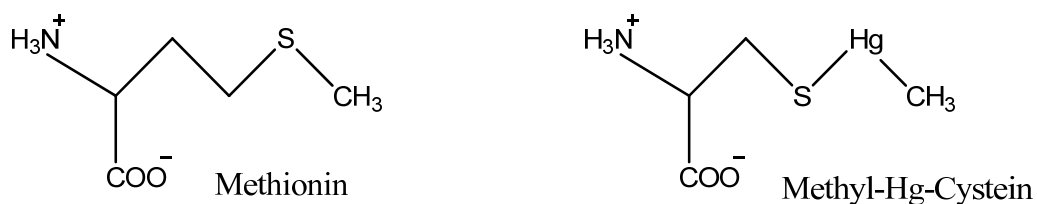


Abbildung 16: „Molecular Mimikry“ in Form von Methionin und Methyl-Hg-Cystein.

Arsen (Arsenat) kann in ähnlicher Weise auch in biochemischen Stoffwechselreaktionen das anorganische Phosphat ersetzen (Abbildung 17). Im Zellinneren reagiert das Arsenat mit der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase anstelle des Phosphats, was zu einer Abnahme des Adenosintriphosphats (ATP) führt (Fuhrmann, 2006).

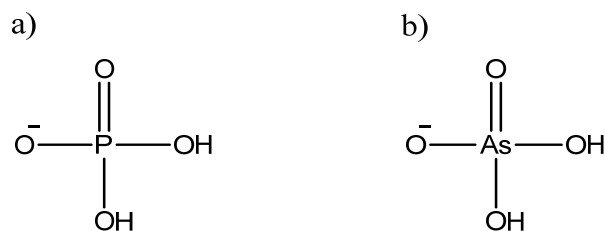


Abbildung 17: Struktureller Vergleich zwischen dem physiologischen Phosphat- (a) und dem toxischen Arsenat- Oxoanion (b). Diese toxischen Ionen können als Substrate im Sinne des molekularen Mimikry in das Zellinnere transportiert werden.

(Fuhrmann, 2006)

Ein wichtiges Strukturelement DNA-bindender Proteine sind sog. "Zinkfinger" in Transkriptionsfaktoren, DNA-Reparaturproteinen und Tumorsuppressorproteinen. Diese Zinkfinger-Proteine können empfindliche Angriffspunkte für Arsen(III) sowie seine dreiwertigen, methylierten Metabolite sein. Dabei kommt es mutmaßlich nicht zu einer direkten Einwirkung auf die DNA, sondern zu einer Verdrängung des Zink-Ions aus seiner Bindung zu Metallothioneinen. So findet die Hemmung der an der Basen-Exzisionsreparatur beteiligten Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) bereits bei umweltrelevanten Konzentrationen im unteren nanomolaren Bereich statt (Walter *et al.*, 2007).

Am Beispiel des Arsens sollen die toxikologischen Wirkungen im folgenden Abschnitt weiter verdeutlicht werden.

4.2 Toxizität metall(oid)organischer Verbindungen

Während die Toxizität der anorganischen Formen etwa von Arsen, Bismut oder Quecksilber meist sehr gut dokumentiert ist, und einige von ihnen zudem als relativ wenig giftig eingestuft werden (z.B. Zinn oder Bismut), können deren methylierte, metallorganische Verbindungen hoch toxisch sein (siehe Dimethylquecksilber).

Wie bereits beschrieben konkurriert As(V) mit Phosphat und hat daher eine toxische Wirkung. As(III) bindet sehr stark an Proteinphosphatasen, hier besonders an die Thiolgruppen im aktiven Zentrum und sorgt damit für eine dauerhafte Aktivierung von Signalwegen. Im Dezember 2010 veröffentlichte die US-Weltraumbehörde NASA sogar die Entdeckung einer neuen Lebensform im Mono Lake, einem kalifornischen Salzsee. Wolfe-Simon *et al.* entdeckten dort einen Mikroorganismus, der unter der Verwendung von Arsen anstelle von Phosphor in der Lage ist, zu wachsen und sich zu reproduzieren (Wolfe-Simon *et al.*, 2009). In den Nukleinsäuren und Proteinen dieses Bakteriums (Stamm GFAJ-1 des *Haloquadratum walsbyi*) kann ein Großteil des Phosphats durch Arsenat ersetzt werden.¹¹ (Wolfe-Simon *et al.*, 2010).

Auf den Menschen können einige Arsenverbindungen, nicht zuletzt aus den oben genannten Gründen, hochtoxisch wirken und sind als kanzerogen, teratogen und mutagen eingestuft, andere wiederum, wie beispielsweise Arsenozucker, gelten als weitgehend ungiftig. Die akute Toxizität von Arsen ist also sehr stark von der vorhandenen Spezies ab-

Tabelle 6: Überblick über LD₅₀-Werte für verschiedene Arsenverbindungen.

Verbindung	LD ₅₀ (Maus)
Arsentrioxid	35 mg kg ⁻¹
Natrium-Monomethylarsenat	1800 mg kg ⁻¹
Natrium-Dimethylarsenit	1200 mg kg ⁻¹
Trimethylarsin	7800 mg kg ⁻¹
Arsenobetain	>10.000 mg kg ⁻¹

(Todorov *et al.*, 2005)

¹¹ Nasa, 02.12.2010:

http://www.nasa.gov/topics/universe/features/astrobiology_toxic_chemical.html ;

Science Express, 02.12.2010: <http://www.sciencemag.org/content/early/recent>

hängig. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die LD₅₀-Werte verschiedener Arsenverbindungen und verdeutlicht die extremen Toxizitätsunterschiede einzelner Arsenspezies. Speziell in Fisch und Meeresfrüchten kann Arsen in bis zu 50 verschiedenen organischen Arsenverbindungen vorliegen, wobei für die meisten die toxikologische Wirkung unbekannt bleibt (Francesconi, 2010).

Wie schnell gerade diese leichtflüchtigen, fettlöslichen, metall(oid)organischen Verbindungen Barrieren oder auch die Haut durchdringen können soll später im speziellen Teil (Kapitel 3, Seite 137) aufgezeigt werden.

In den letzten Jahren wurde zudem immer deutlicher, dass es auch zu einer direkten Einwirkung dieser Verbindungen auf den Menschen kommen kann und diese im Körper auch gebildet werden können (vgl. allgemeiner Teil, Kapitel 2.1 bis 2.5). Direkte toxikologische Tests mit leichtflüchtigen metall(oid)organischen Verbindungen sind allerdings äußerst problematisch. Zum einen ist die Handhabung (Stabilität der Verbindungen) und damit die Exposition schwierig, zum anderen benötigen die Zellen grundsätzlich ihr entsprechendes Nährmedium. Bei der Exposition gegen leichtflüchtige (metall(oid)organische) Verbindungen tritt daher bereits oft ein Großteil dieser aus der Lösung heraus bevor die Zellmembran passiert wird (Ehrenstein *et al.*, 2002) bzw. sind die Verbindungen erst gar nicht im Nährmedium löslich. Daher benötigen die toxikologischen Tests der leichtflüchtigen metall(oid)organischen Verbindungen, im Vergleich zu toxikologischen Tests von nicht flüchtigen, wasserlöslichen Verbindungen ein komplett anderes experimentelles Design, welches vor kurzem von Dopp *et al.* entwickelt wurde. Mit diesem System können sowohl zytotoxische als auch genotoxische Effekte ermittelt werden. Auf den Versuchsaufbau und die zytotoxischen Effekte soll im speziellen Teil (Kapitel 4.1, Seite 163) detailliert eingegangen werden. Die parallel mittels Comet-Assay¹² durchgeführten genotoxikologi-

¹² Mittels des s.g. Comet-Assays lassen sich DNA-Doppel- und Einzelstrangbrüche feststellen und so genotoxische Effekte nachweisen. Das Prinzip des Comet-Assays beruht auf der Elektrophorese, wobei bruchstückhafte DNA innerhalb des Feldes wandert. Unter dem Mikroskop erscheinen

schen Ergebnisse sollen hier nur kurz zusammengefasst werden, da sie nicht Bestandteil dieser Arbeit waren. Aufgrund der hohen Zytotoxizität war eine genotoxische Betrachtung von Me_2Hg erst gar nicht möglich. Für Me_4Sn wurde hingegen bis zu einer Konzentration von $429\text{ }\mu\text{mol/l}$ in CHO-Zellen keine Genotoxizität festgestellt. Me_3As zeigte erst bei zytotoxisch relevanten Konzentrationen signifikant erhöhte „tail moments“ im Comet-Assay. Die vollständigen Ergebnisse zur Genotoxizität finden sich, zusammen mit den im speziellen Teil dieser Arbeit aufgeführten Daten zur Zytotoxizität, in: „Dopp E *et al.*, Toxicity of volatile methylated species of bismuth, arsenic, tin and mercury in mammalian cells in vitro. *Journal of Toxicology* (Special Issue: Toxicity of Organometal(loids)) 2011“ (Article ID 503576; ein Reprint des gesamten Artikels befindet sich im Anhang) und im Buchkapitel „Early molecular changes in the genome of arsenic-exposed human urothelial cells depending on cellular uptake and biotransformation“ (Zdrenka *et al.*, 2010). Der Nachweis neurotoxischer Effekte verlangt einen vollständig anderen experimentellen Aufbau, welcher ebenfalls speziell auf die Verwendung leichtflüchtiger Spezies ausgerichtet werden muss. Der Aufbau wurde in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Münster entwickelt; einige Ergebnisse zur Neurotoxizität von zinnorganischen Substanzen sowie von Monomethyl- und Dimethylarsen sollen hier beispielhaft vorgestellt werden.

Dazu wurde mit Hilfe elektrophysiologischer Techniken an Hippocampus-Schnittpräparaten juveniler und adulter Ratten die Effekte der metall(oid)organischen Verbindungen auf die exzitatorischen postsynaptischen Potenziale, die Langzeitpotenzierung sowie auf die präsynaptischen Prozesse an den Schaffer-Kollateral/CA1-Synapsen untersucht (paired-pulse facilitation). Für die zinnorganischen Substanzen belegen die durchgeführten Versuche eine starke und selektive Wirkung auf Mechanismen der glutamatergen synaptischen

die beschädigten Zellen, mit einem Schweif aus DNA Bruchstücken, der ihnen das Aussehen eines Kometen gibt.

Übertragung. Auch die arsenorganischen Substanzen zeigen sehr unterschiedliche Wirksamkeiten. Während die fünfwertigen methylierten Arsenverbindungen MMA(V) und DMA(V) keinerlei Einfluss auf die synaptische Transmission haben, führen die dreiwertigen Verbindungen MMA(III) und DMA(III) zu einer Hemmung sowohl der Amplituden exzitatorischer postsynaptischer Potenziale (fEPSPs) wie auch der Langzeitpotenzierung, die schon bei Konzentrationen ab 1 $\mu\text{mol/l}$ wirksam wird und bei höheren Konzentrationen (10, 100 $\mu\text{mol/l}$) zu einer kompletten Unterdrückung der Amplituden führt. Dabei ist die Wirkung bei Applikation von DMA(III) etwas stärker als bei der von MMA(III) und bei jungen Tieren jeweils stärker ausgeprägt als bei adulten Tieren. Die Untersuchungen an den in-vitro-Schnittpräparaten zeigten auch, dass diese metall(oid)organischen Verbindungen die synaptischen Funktionen beträchtlich stören können (Krüger *et al.*, 2007); (Krüger *et al.*, 2009).

Arsen- Metabolismus

Viele Studien beschreiben MMA(III) als wichtigen Metaboliten im humanen Arsenzyklus. Die Methylierung des Arsens findet hauptsächlich in der Leber unter Beteiligung von Methylendonoren wie S-Adenosylmethionin (SAM) und Gluthation (GSH) statt (Dopp, 2007). Obwohl ein Großteil des Arsens über den Urin als DMA(V) wieder ausgeschieden wird, akkumulieren die methylierten Spezies in der Leber, den Haaren und den Nieren (Abbildung 18).

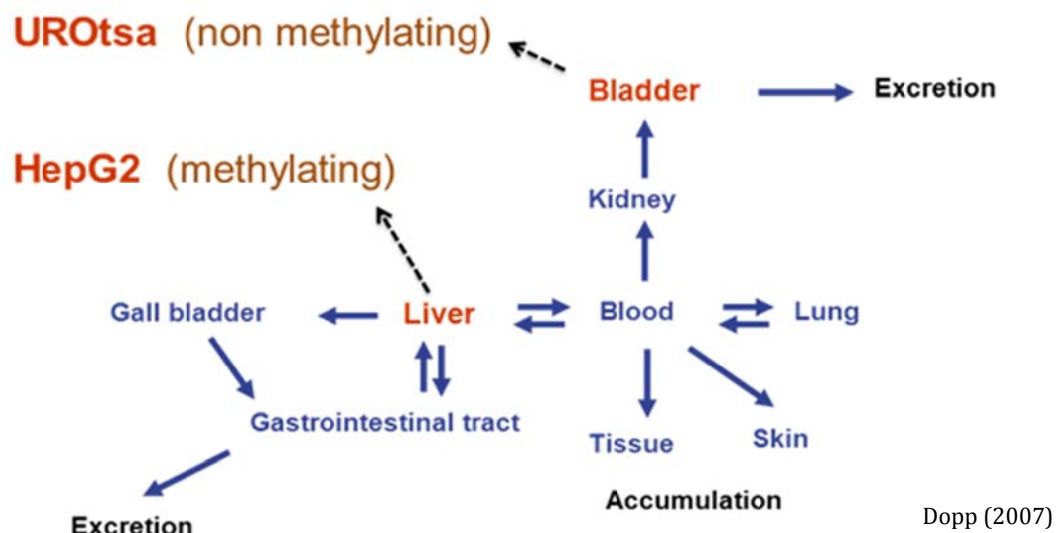


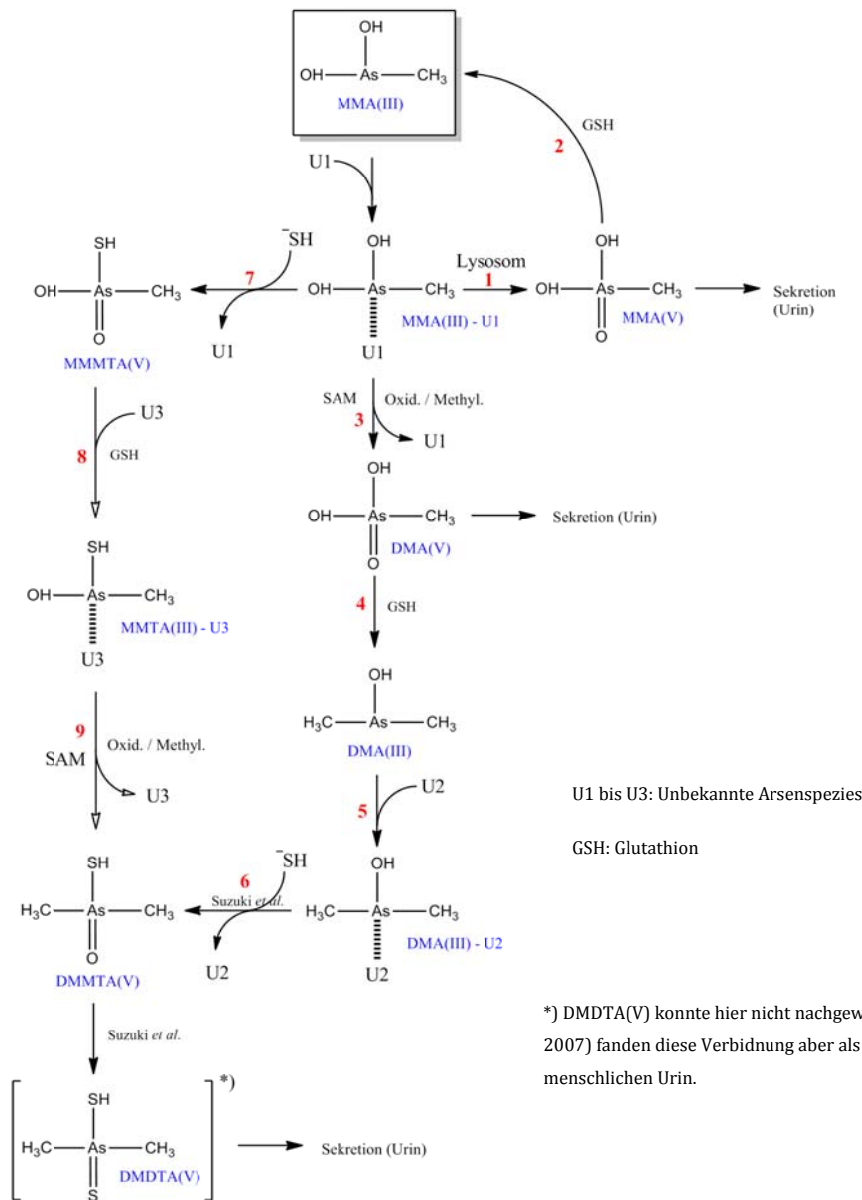
Abbildung 18: Übersicht zur Verteilung von Arsen im Körper sowie der Biomethylierung in der Leber. Nach Speicherung und Methylierung in der Leber wird Arsen nur langsam über den Urin wieder eliminiert.

DMA(V) und MMA(V) können daher als Hauptmetabolite (Anteil: 84% bzw. 12%) im menschlichen Urin nachgewiesen werden, wobei eine signifikante Korrelation mit dem Konsum von Meeresfrüchten und anderen Lebensgewohnheiten nachweisbar ist (Fillol *et al.*, 2010).

Während hohe, kurzzeitige Arsen-Dosierungen zur Krebstherapie eingesetzt werden, führen chronische Arsenexpositionen häufig zu Haut-, Harnblasen- und Leberkrebs. Die Mechanismen der Kanzerogenese, insbesondere bei frühen Ver-

änderungen, sind bisher aber nur teilweise bekannt. Innerhalb des DFG Forschungsprojektes *„Analyse früher molekularer Veränderungen im Genom arsen-exponierter humaner Urothelzellen in Abhängigkeit von der zellulären Aufnahme und der Biotransformation einzelner Arsenspezies“* sollen die Aufnahmekapazität von humanen Urothelzellen für Arsenverbindungen, deren subzelluläre Verteilung und Ausschleusung sowie deren intrazelluläre Biotransformation in Urothelzellen im Vergleich zu Hepatozyten untersucht und Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene erfasst werden.

Im Rahmen eigener, vorangegangener Arbeiten wurden bereits die analytischen Methoden zur intrazellulären Arsenspezifizierung nach Exposition der Zellen gegen MMA(III) erstellt und die Möglichkeit zur schnelleren und besser auflösenden Chromatographie geschaffen (Hippler, 2011). So konnte eine vielfältige Speziesumwandlung, im Lysat von HepG2-Zellen nach Exposition gegen MMA(III) beobachtet werden (Hippler *et al.*, 2011). Es stellte sich heraus, dass die Methylierung zeitlich betrachtet kein kontinuierlich ablaufender Prozess ist. Durch die verbesserte Trennleistung konnten zudem erstmals Monomethylmonothioarsenat (MMMTA(V)) sowie weitere, unbekannte (Thio?-) Arsenspezies in den Lysaten von HepG2-Zellen nachgewiesen werden (Hippler, 2011). Basierend auf den durchgeführten Expositionsreihen konnte ein neuer Reaktionspfad für die Biomethylierung von MMA(III) in HepG2-Zellen vorgeschlagen werden (Abbildung 19). Allerdings blieben bisher einige Fragen offen, die hier im speziellen Teil (Kapitel 4.2, Seite 182) erneut aufgegriffen werden sollen. Zum einen stellte sich die Frage, um welche unbekannten Arsenspezies es sich handelt, zum anderen blieb ungeklärt, wie viel Arsen überhaupt in die Zellen eindringt bzw. in oder an der Zellmembran und anderen, nicht löslichen Zellbestandteilen vorhanden ist. Auch in welcher Form (Methylierungsgrad) es dort vorliegt blieb unklar. Zudem besteht die Frage, wieso und wo in der Zelle eine Oxidation stattfinden kann.



(Hippler, 2011)

Abbildung 19: Vorgeschlagener Pfad zur Bildung von MMTA(V) und DMDTA(V) in Lysaten aus HepG2 Zellen nach Exposition der Zellen gegen MMA(III). Das an die unbekannte Verbindung U1 gebundene MMA(III) kann auf unterschiedlichen Wegen abgebaut werden. Möglich ist zum Einen eine direkte Oxidation zu MMA(V), welches durch Sekretion später im Urin nachgewiesen werden kann (Weg 1). Zum Anderen besteht die Möglichkeit des Abbaus entweder über DMA(V) (Weg 3,4,5,6) oder direkt über die Thiospezies unter Bildung des MMTA(V) (Weg 7,8,9). Endprodukt ist bei beiden Wegen das von Suzuki *et al.* beschriebene DMDTA(V).

Spezieller Teil

Im speziellen Teil werden einzelne Aspekte in der Speziesanalytik metall(oid)organischer Verbindungen aufgegriffen und ausgewählte, aktuelle Forschungsprojekte wie die Speziesbestimmung in der Biogasproduktion und die Permeation durch Arbeitsschutzmaterial vorgestellt.

Weiterhin sollen spezielle Fortschritte und neue, sowie weiterführende Arbeiten in den laufenden toxikologischen Projekten (Spezierung von Arsen in Leber- und Blasen zellen) diskutiert werden.

1. Metallorganische Verbindungen in Biogasanlagen

Auf die toxikologische Wirkung metall(oid)organischer Verbindungen, die Auswirkungen auf die Umwelt und deren Relevanz für den Menschen wurde bereits in den vorangegangenen Kapiteln im allgemeinen Teil eingegangen. Auch der Prozess der Biomethylierung ist seit langem bekannt und wurde bereits im allgemeinen Teil (Kapitel 2, Seite 13) beschrieben.

In zahlreichen Untersuchungen wurde auch die Bedeutung von Arsen als essentielles Element (Ultraspurenelement) für die Ernährung von Tieren nachgewiesen (McDowell *et al.*, 2003) und findet so als Futterzusatzstoff Verwendung (z.B. Roxarson). Ein Großteil dieser Verbindungen wird unverändert wieder ausgeschieden und findet sich in den Exkrementen dieser Tiere wieder, wo sie u.a. nach dem oben genannten Challenger-Mechanismus weiter in methylierte Spezies umgewandelt werden können (Momplaisir *et al.*, 2001).

Biogasanlagen bieten aufgrund ihrer biologischen Aktivität, den vorherrschenden Temperaturen und den eingesetzten Stoffen ebenfalls optimale Voraussetzungen zur Bildung methylierter, organischer Verbindungen, wie sie bereits in Kläranlagen, Mülldeponien oder im Kompost nachgewiesen werden konnten. Inwieweit auch Biogasanlagen dazu beitragen, welche Spezies dort gebildet werden und wie sich diese auf die einzelnen Phasen (Biogas, Gaskondensat, Gärsubstanzen) verteilen ist bisher nicht untersucht. Ein erstes Screening ob und in welcher Form (Spezies) methylierte, metall(oid)organische Verbindungen in diesen Anlagen vorkommen soll im Folgenden durchgeführt werden.

1.1 Biogasanlagen

Biogas (Methan) entsteht, wenn Biomasse, d.h. organisches Material wie Mais, Getreide, Schilfgras (Energiepflanzen), Reststoffe wie Ernterückstände, tierische Exkremente (z.B. Gülle, Mist), Nebenprodukte der Lebensmittelproduktion oder andere organische Abfälle (z.B. Klärschlamm), unter Ausschluss von Licht und Sauerstoff durch Bakterien abgebaut wird. Besonders geeignet zur Biogaserzeugung ist organisches Material mit hohem Wassergehalt. In der Praxis wird daher in landwirtschaftlichen Biogasanlagen vor diesem Hintergrund überwiegend Rinder- und Schweinegülle sowie Mist von Rindern, Schweinen und Hühnern vergoren. Der technische Aufbau einer solchen Anlage ist in Abbildung 20 dargestellt.

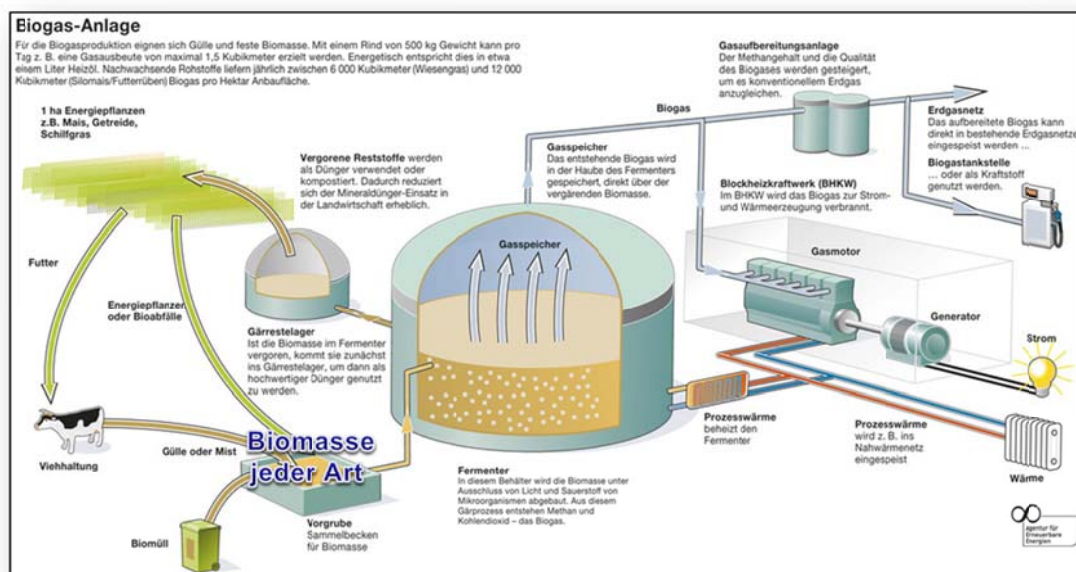


Abbildung 20: Technische Skizze einer Biogasanlage (Bildquelle: Webseite der "Agentur für Erneuerbare Energien")

Für einen möglichst hohen Biogasertrag werden so genannte Kosubstrate eingesetzt, bei denen es sich um eigens angebaute Energiepflanzen oder Reststoffe handelt. Ein Überblick über verschiedene Energiepflanzen findet sich in der Broschüre der Agentur für Erneuerbare Energien e.V. (Agentur für Erneuerbare Energien e.V., 2011).

Biogas besteht zu etwa 45 bis 70% aus Methan (CH₄), Kohlendioxid (CO₂, 25-50 Vol%) sowie Sauerstoff, Stickstoff und anderen Spurengasen (siehe Tabelle 7). Der Hauptbestandteil, das Methan, ist energetisch nutzbar (Stromerzeugung).

Tabelle 7: Zusammensetzung von Biogas

Komponenten	Schwankungsbreite	Durchschnitt
Methan	45–70 %	60 %
Kohlenstoffdioxid	25–55 %	35 %
Wasserdampf	0–10 %	3,1 %
Stickstoff	0,01–5 %	1 %
Sauerstoff	0,01–2 %	0,3 %
Wasserstoff	0–1 %	< 1 %
Ammoniak	0,01–2,5 mg/m ³	0,7 mg/m ³
Schwefelwasserstoff	10–30.000 mg/m ³	500 mg/m ³

Quelle: DVGW, Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches e.V. (2012)

Auch metall(oid)organische Verbindungen entstehen vielfach durch mikrobiologische Prozesse. Wie bereits beschrieben gibt es viele Orte an denen eine solche Biomethylierung zu erwarten oder auch erwünscht ist. Dazu zählen Kläranlagen, Kompostwerke, Mülldeponien und eben auch Biogasanlagen. Im Institut für Umweltanalytik wurden solche Hotspots mehrfach untersucht, was bereits mit der Beprobung von Mülldeponien im Jahre 1994 durch J. Feldmann begann (Feldmann *et al.*, 1994). Eine kurze Auswahl der bereits durchgeführten Projekte findet sich in Tabelle 8.

In allen Projekten (Mülldeponien, Kompostwerke, Kompost, usw.) konnten metall(oid)organische Verbindungen nachgewiesen werden. Es liegt daher nahe, dass auch in Biogasanlagen diese Verbindungen vorhanden sind. Zur Metall(oid)-Speziesanalytik wurden daher sowohl Proben des Biogases als auch Proben aus den Anmischbecken, den Nachgärern sowie des Kondenswassers untersucht.

Tabelle 8: Übersicht über untersuchte Hotspots metall(oid)organischer Verbindungen am Institut für Umweltanalytik

Ort	Publikation, Jahr
Mülldeponien	(Feldmann <i>et al.</i> , 1994) (Hirner <i>et al.</i> , 1994) (Feldmann <i>et al.</i> , 1995)
Erdgas	(Hippler <i>et al.</i> , 2004)
Kompostwerke	(Raabe <i>et al.</i> , 2006) (Raabe <i>et al.</i> , 2005)
Kompost	(Diaz-Bone <i>et al.</i> , 2011)
Biogasanlagen	erste Untersuchungen in dieser Arbeit

Aufgrund der komplexen Matrix, gerade der Anmaischbecken und der Nachgärer der Biogasanlagen mussten einzelne Proben aufgeteilt und mehrfach mit Hilfe verschiedener Analysemethoden (Hydridgenerierung-GC/ICP-MS bzw. HPLC/ICP-MS) auf metall(oid)organische Spezies untersucht werden. Auf die Methoden wird in den jeweiligen Abschnitten einzeln hingewiesen.

1.2 Probennahme, Probenbeschreibung, Probenlagerung

Die Probennahmen an den Biogasanlagen erfolgten unter Leitung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (Bezirke M und L) sowie eines Mitarbeiters des Instituts für Umweltanalytik der Universität Duisburg-Essen. Beprobt wurden vier verschiedene Biogasanlagen (hier als Anlagen A bis D bezeichnet) in den Bezirken „M“ und „L“. Weitere Angaben zu den Anlagen, wie die Abfallbeschreibungen (Inputmaterialien) und die Probennahmebedingungen finden sich in kurzer Form in den folgenden Anlagenbeschreibungen sowie in den jeweiligen Probennahmeprotokollen.

Tabelle 9: An den Biogasanlagen entnommene Proben

Probe	Probenmaterial	Probenbehälter
1	Gaskondensat	PE / Glasflasche
2	Gärgas	Gasbeutel (2x10L)
3	Nachgärer /Endlager	PE / Glasflasche
4	Anmaischbecken	PE / Glasflasche

Biogasanlage A: Nawaro – Biogasanlage

Abfallbeschreibung:

Rinder- und Schweinegülle, Maissilage, Zuckerrübenmus, Geflügelkot, Rinderkot, weitere Angaben siehe Probennahmeprotokoll.

Biogasanlage B: Cofermenter Biogas

Abfallbeschreibung:

Brauerei,- Saucen- und Flotationsschlamm, Fette, Speise- und Gemüsereste, Blutrückstände, Kuddeleirückstände, Kot, Gülle etc., weitere Angaben siehe Probennahmeprotokoll.

Biogasanlage C: Biogasanlage

Abfallbeschreibung:

Rinder- und Schweinegülle, Pansen-, Magen- und Darminhalt, Fett- und Flotationsschlämme, Küchen- und Kantinenabfälle, Spelzen, Getreidestaub, pflanzliche Futtermittel, Garten- und Parkabfälle, Rasenschnitt, weitere Angaben siehe Probenahmeprotokoll.

Das Gärgas musste aufgrund des herrschenden Unterdrucks in die Gasbeutel gepumpt werden.

Biogasanlage D: Biogasanlage

Abfallbeschreibung:

Maissilage, Schweinegülle, Regen- und Oberflächenwasser, Sickersaft aus Maissilage, weitere Angaben siehe Probenahmeprotokoll.

Das Gärgas musste aufgrund des herrschenden Unterdrucks in die Gasbeutel gepumpt werden.

Die Probennahmestellen an den Biogasanlagen sowie die Bezeichnungen der Proben sind in Abbildung 21 dargestellt.

Biogasproben (Gärgase) wurden in Gasbeuteln (s.g. Tedlar-Bags, 10 Liter) abgefüllt, welche eine kurzzeitige Lagerung der Gase bei nur geringem Verlust der metall(oid)organischen Spezies, auch permethylierter Verbindungen erlauben (Haas *et al.*, 2000). Ein direkter, passender Anschluss zur Probennahme war nur an den Anlagen A (Abbildung 44, Seite 116) und D vorhanden. Bei den Anlagen B und C war die Installation einer behelfsmäßigen Probennahmestelle notwendig. Aufgrund der gegebenen Bedingungen war es in der Regel nicht möglich, die

Probennahmeapparatur mit größeren Volumina des Biogases zu spülen. An Anlagen, an denen ein Unterdruck herrschte (Anlagen C und D), wurden die Beutel mittels einer Pumpe (BUCK I.H. Pump, Buck Inc., USA) befüllt. Die Lagerung der Proben erfolgte im Dunklen bei Raumtemperatur bis zur zeitnahen Messung mittels Gaschromatographie und induktiv gekoppeltem Plasma-Massenspektrometer (GC/ICP-MS). Bereits bei der Rückfahrt von der Probennahme stellte sich heraus, dass der Gasbeutel der Anlage C, Probe 1 undicht ist. Bei der Ankunft an der Universität Duisburg-Essen war dieser Tedlar-Bag nahezu vollständig entleert, sodass eine Analyse dieser Probe nicht mehr möglich war.

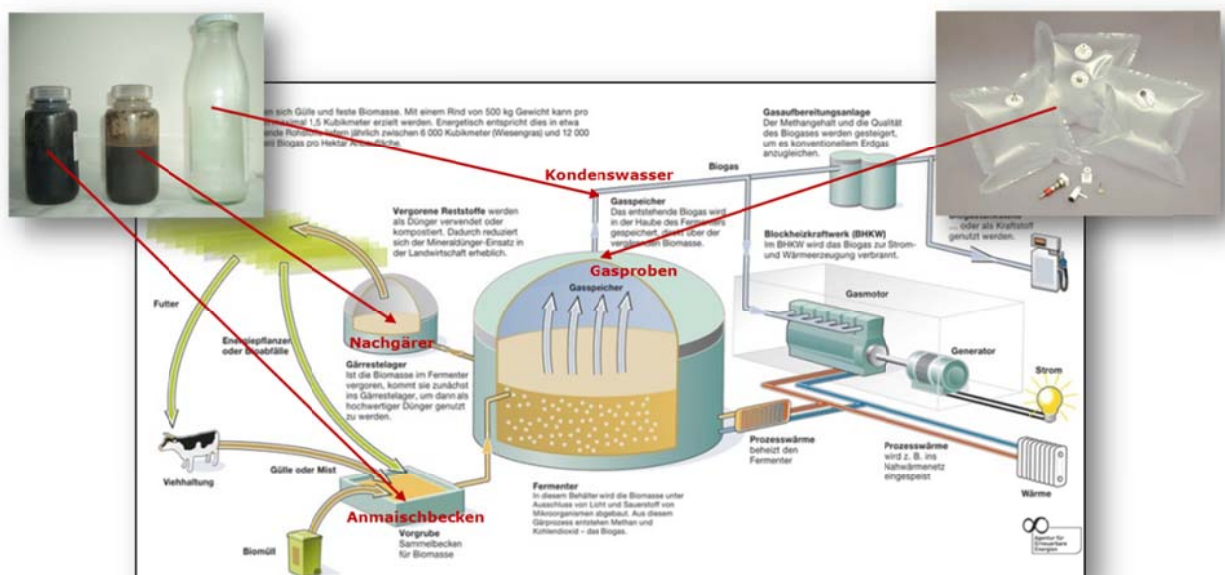


Abbildung 21: Probennahmestellen an den Biogasanlagen (Bildquelle: Webseite der "Agentur für Erneuerbare Energien")

Die Gaskondensate (klare bis trübe, wässrige Flüssigkeiten) bzw. die Proben aus den Anmaischbecken und den Nachgärern (heterogene, schlammige Suspension) wurden in 250 ml / 500 ml PE bzw. Glasbehälter abgefüllt (Abbildung 22) und nach dem Transport bei 4°C im Dunkeln gelagert. Aufgrund der sehr heterogenen Zusammensetzung der Proben aus den Anmaischbecken und Nachgärern

wurden diese vor den Analysen mittels eines Stabmixers homogenisiert. Alle Messungen erfolgten möglichst zeitnah um Speziesumwandlungen zu minimieren. Die Probenvorbereitungen und Analysenmethoden werden in den einzelnen Kapiteln eingehender beschrieben.



Abbildung 22: Repräsentative Proben aus den beprobten Biogasanlagen: a) Anmaischbecken, b) Nachgärer, c) Kondenswasser

1.3 Methoden

1.3.1 Bestimmung des Gesamtquecksilbers

Die Bestimmung des Gesamtquecksilbers erfolgte mittels des in Kapitel 3.1 (allgemeiner Teil, Seite 38) beschriebenen DMA 80 Gesamtquecksilber-Analysators. Vor der Analyse wurden die extrem inhomogenen Proben aus den Anmischbecken und Nachgärern intensiv homogenisiert. Anschließend wurden etwa 100 bis 250 mg der Proben in die Analysenschiffchen des DMA 80 eingewogen und dort gemessen. Aus den Gaskondensaten konnte der Quecksilbergehalt ohne weitere Vorbehandlung (lediglich Schütteln der Probe) nach Einwaage von etwa 100 µl direkt bestimmt werden. Die Nachweisgrenze des hier eingesetzten Gerätes liegt bei 0,02 ng Hg (absolut), was bei einer Einwaage von 100 µl einer Konzentration von 0,2 µg/l entspricht.

1.3.2 Speziesbestimmung im Biogas (As, Sb, Hg Spezies)

Zur Analyse der Biogasproben (Doppelbestimmung) wurden zunächst je 4 Liter des Gasvolumens aus den 10 Liter Gasbeuteln (Tedlar Bags) auf eine mit Supelcoport (10% SP – 2100 on, Supelco, Bellefonte, USA) gepackte und gekühlte Säule (U-Rohr / -120°C) aufgegeben. Zur weiteren Abtrennung der Matrix (Wasser, CO₂) wurde das U-Rohr ausgeheizt und so die Metall(oid)spezies in den ebenfalls gekühlten (-80°C) Injektor (UNIS 2100, Joint Analytical Systems, Moers) des Gaschromatographen (Agilent 5973, Agilent, Waldbronn) überführt. Die Trennung der leicht flüchtigen Metall(oid)spezies erfolgte auf einer 30m Kapillarsäule (Rtx®-5Sil, Restek GmbH, Bad Homburg). Zur Detektion wurde der Gaschromatograph über eine Transferline und ein T-Stück an ein ICP-MS (7500a, Agilent, Waldbronn) gekoppelt. Auf eine gleichzeitige Nutzung des Massenspektrometers (EI) wurde verzichtet. Das Gerät ist mit einem Micro Flow Nebulizer MFN100 aus Fluoropolymeren (Agilent) sowie einer Standardsprühkammer (Quartz)

ausgestattet, über den die Zugabe des internen Standards (^{103}Rh , 10 ppb) erfolgte. Die wichtigsten methodischen Parameter wie Gasflüsse, RF-Energie, analysierte Isotope usw. sind in Tabelle 10 aufgeführt. Als Performance-Test des ICP-MS wurde täglich ein neuer „Tune-Report“ erstellt.

Tabelle 10: Geräteparameter GC / ICP-MS zur Speziesbestimmung im Biogas

Gerät	Parameter
GC:	
Agilent 5973	Trärgas Helium
Injektor:	Mode: Solvent Vent -80°C → 800°C/min → 320°C konst.
Oven:	Start: 50°C → 10°C/min → 120°C 30°C/min → 320°C
Transferline GC → ICP-MS	250°C (Maximum)
ICP-MS:	
Agilent 7500a	
RF - Energie	1580 W
Plasma - Gas	15 l/min (Argon)
Carrier - Gas	~ 0,8 l/min
Make up - Gas	~ 0,25 l/min
Sample depth	5,2 mm
Sprühkammer	Quarz, cooled, 2 °C
Gemessene Isotope (m/z)	^{75}As , ^{35}Cl , $^{77}({}^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl})$ ^{34}S , ^{121}Sb , ^{123}Sb , ^{200}Hg , ^{202}Hg , ^{118}Sn , ^{120}Sn , ^{103}Rh (interner Standard)

Die Identifizierung der Spezies erfolgte zumeist über Retentionszeitabgleich mit externen Standards sowie über eine Siedepunkt-Retentionszeit-Korrelation (Kapitel 3.3, ab Seite 46). Die Ergebnisse finden sich in Kapitel 1.4.1 (spezieller Teil, Seite 76).

1.3.3 Speziesbestimmung im Anmischbecken, Nachgärer und Kondensat (Hydridgenerierung)

Leichtflüchtige, permethylierte metall(oid)organische Verbindungen wie z.B. Trimethylarsen (Me_3As), Dimthylquecksilber (Me_2Hg) oder Tetramethylzinn (Me_4Sn) lassen sich ohne vorhergehende Derivatisierung aus der flüssigen Phase mittels Helium austreiben (purgen). Teilmethylierte Verbindungen müssen zunächst derivatisiert / hydriert werden um sie in ihre korrespondierenden flüchtigen Derivate (Hydride) zu überführen, welche im Anschluss der GC-Analyse zugeführt werden können (vgl. allgemeiner Teil, Kapitel 3.3, ab Seite 44).

Zur Hydrierung und anschließenden GC-Analyse wurden etwa 2 g der zuvor homogenisierten Proben aus den Anmischbecken bzw. Nachgärern in ein 20 ml Vial eingewogen, mit 5 ml Citrat-Puffer versetzt und auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt. Die Kondensate konnten ohne weitere Vorbehandlung direkt eingewogen werden. Anschließend wurde ein Magnetührstäbchen hinzugefügt, das Vial mit einem Septum verschlossen und an die GC/ICP-MS Apparatur angeschlossen (Abbildung 15, Seite 47). Nach Zugabe von 1 ml einer 10%igen NaBH_4 -Lösung wurde die Probe für 10 Minuten mittels Helium (~ 100 ml/min) „gepurged“. Dabei wurde der pH-Wert durch weitere Zugabe von Säure langsam herabgesetzt um möglichst alle Elemente ihrer Spezies entsprechend zu derivatisieren und unterschiedliche Derivatisierungseffizienzen bei verschiedenen pH-Werten zu vermeiden.

Aufgrund des hohen Volumenstroms beim Purgen werden die Analyten zunächst auf eine gepackte und gekühlte Säule (U-Rohr / „cryp-trap“, -120°C) geleitet. Dabei werden die metall(oid)organischen Verbindungen ausgefroren (getrappt). Die weitere Analyse erfolgt analog der Speziesbestimmung im Biogas (Kapitel 1.3.2).

Wie bereits beschrieben unterscheidet die Hydrierung mit NaBH_4 nicht strikt zwischen penta- und trivalenten Antimon- und Arsenspezies. Daher wurde zur Analyse der Arsenspezies zusätzlich eine HPLC-Analyse durchgeführt.

1.3.4 Arsenspeziesbestimmung im Anmaischbecken, Nachgärer und Kondensat (HPLC)

Zur Bestimmung der Arsenspezies in den flüssigen Phasen der Biogasanlagen wurden diese Proben, zusätzlich zu der zuvor beschriebenen Hydridgenerierung, einer HPLC/ICP-MS Analyse unterzogen. Diese Analytik unterscheidet sich nur gering von der Arsenspeziesanalytik, wie sie auch für z.B. Zelllysate (spezieller Teil, Kapitel 4.2, Seite 182) durchgeführt wurde. Die verwendeten Analysengeräte und Kopplungen werden daher ebenfalls in Kapitel 4.2.1 (Seite 183) beschrieben und verwendet.

Zur Chromatographie wurde eine „Agilent 1100“ HPLC (Agilent, Waldbronn) eingesetzt, welche zur Detektion des Arsen-Signals (^{75}As) an ein ICP-MS (Modell 7500a, Agilent, Waldbronn) gekoppelt wurde. Die Laufmittelzusammensetzung zur As-Speziesbestimmung ist in Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 11: Laufmittelzusammensetzung zur Arsen-Speziesbestimmung mittels Flüssigkeitschromatographie.

Substanz	Konzentration
Wasser	95 % (v/v)
Methanol	5 % (v/v)
Malonsäure	2 mmol/l
Tetrabutylammoniumhydroxide (TBAH)	6 mmol/l
pH – Wert	6,0

Die Elution der Arsenspezies erfolgte unter isochratischen Bedingungen mit einem Volumenstrom von 1 ml/min. Aufgrund des starken Einflusses von Methanol auf die Sensitivität des ICP-MS Signals bei der Arsendetektion (Kohlmeyer *et al.*, 2002) war gerade hier eine isochratische Methode wichtig. Als analytische Säule wurde eine Luna, 3 μ C18(2), 150 x 4,6 mm, (Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet. Die Injektion erfolgte mittels eines Autosamplers.

Das Injektionsvolumen für Standards betrug 0,1 bis 5 µl, für Proben 5 µl. Als Performance-Test des ICP-MS wurde auch hier täglich ein neuer „Tune-Report“ erstellt. Einen Überblick über die wichtigsten ICP-MS-Parameter gibt Tabelle 12.

Tabelle 12: ICP-MS Parameter zur Quantifizierung verschiedener Arsenspezies nach externer Kalibration. RF-Energie, Torch-Position und Gasflüsse wurden täglich mit Hilfe der Tunig-Routine optimiert.

ICP-Parameter	Wert
RF - Energie	1580 W
Plasma - Gas	15 l/min (Argon)
Carrier - Gas	~ 0,7 l min ⁻¹
Make up - Gas	~ 0,35 l min ⁻¹
Sample depth	~ 5,7 mm
Sprühkammer	Quarz, cooled, 2°C
Analysierte Isotope	⁷⁵ As, ³⁵ Cl, ⁷⁷ (⁴⁰ Ar ³⁷ Cl), ³⁴ S, ¹³ C

DMA(III) ist nur als Reinsubstanz stabil und wird in wässriger Lösung schnell zu DMA(V) oxidiert. Daher wurde dieser Standard generell vor der jeweiligen Messung aus der Originalsubstanz neu angesetzt, falls dieser benötigt wurde, und findet sich daher nicht in allen Chromatogrammen wieder.

1.4 Ergebnisse und Diskussion

Präsentiert und diskutiert werden hier im Allgemeinen die metall(oid)organischen Spezies in den jeweiligen Biogasanlagen. In den flüssigen Proben der Biogasanlagen (Anmaischbecken, Nachgärer, Kondensat) wurde zusätzlich der ges. Quecksilbergehalt am Institut für Umweltanalytik der Universität Duisburg-Essen bestimmt. Die Ermittlung der Gesamtmetallgehalte an Arsen, Antimon, Zinn und weiteren Metall(oid)en erfolgte, laut der Projektvereinbarung in den Laboren des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW¹³.

1.4.1 Speziesbestimmung im Biogas (As, Sb, Hg Spezies)

Zur Analyse der Biogasproben (Doppelbestimmung) wurden, wie im Methodenteil beschrieben, je 4 Liter des Gasvolumens (aus 10 Liter Gasbeuteln) auf eine gekühlte Säule aufgegeben und die einzelnen, leicht flüchtigen Metall(oid)spezies chromatographisch getrennt. Zur Detektion wurde ein ICP-MS (zeitaufgelöste Aufnahme der entsprechenden Massenspuren (m/z) / vgl. allgemeiner Teil, Kapitel 3.2, Seite 40) eingesetzt. Die Identifizierung der Spezies erfolgte zumeist über Retentionszeitabgleich mit externen Standards. Für die Spezies Dimethylquecksilber (Me_2Hg) und Trimethylarsin (Me_3As) sind die Chromatogramme der entsprechenden Standardverbindungen mit ihren Retentionszeiten in der folgenden Abbildung 24 beispielhaft dargestellt.

¹³ Leider lagen diese Werte zum Abgabezeitpunkt dieser Arbeit noch nicht vor und können so in die abschließende Diskussion nicht einbezogen werden.

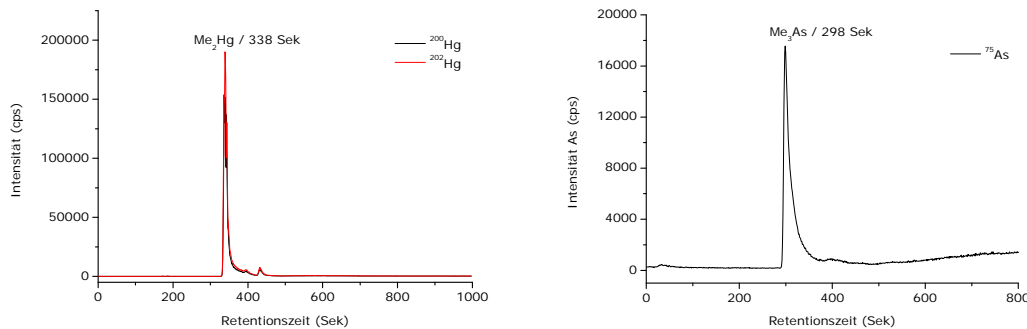


Abbildung 23: Chromatogramme zur Bestimmung der Retentionszeiten von Me_2Hg (links) und Me_3As (rechts) mittels ICP-MS.

Weitere Metall(oid)spezies wie z.B. Trimethylantimon (Me_3Sb) können, auch wenn kein Standard vorhanden ist, mittels Siedepunkt / Retentionszeitkorrelation identifiziert werden (Kresimon, 2002), (Amouroux *et al.*, 1998). Zur Korrelation der Spezies mit Kohlenstoff (^{13}C) und Schwefel (^{34}S) wurden auch diese Elemente zusätzlich zu den Metall(oid)en aufgezeichnet, sind hier aber nicht zusätzlich dargestellt.

In den folgenden Abschnitten und Abbildungen werden die Chromatogramme der Speziesanalysen im Biogas der Anlagen A bis D für die einzelnen Metall(oid)e (As, Sb, Hg und Sn) diskutiert.

1.4.1.1 Arsenspezies

In allen Biogasproben der Anlagen A bis D konnte Trimethylarsin (Me_3As) nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich sowohl zwischen den verschiedenen Anlagen als auch zwischen den einzelnen Proben zum Teil recht große Konzentrationsunterschiede für diese Spezies. Während in Anlage A lediglich 45-50 ng $\text{Me}_3\text{As}/\text{m}^3$ detektiert werden konnten, wurden in Probe 1 der Anlage B 694 ng/ m^3 nachgewiesen. Hohe Konzentrationen der trimethylierten Arsenspezies konnten auch im entsprechenden Kondenswasser der Biogasanlage B nach-

gewiesen werden (vgl. spezieller Teil, Kapitel 1.4.4.3, Seite 113). Im Vergleich dazu befanden sich in der Biogasprobe 2 der gleichen Anlage nur noch Spuren (40 ng/m^3) dieser Spezies, was konzentrationsmäßig sowohl mit Anlage A als auch mit den folgenden Anlagen C (67 ng/m^3) und D (38 bzw. 31 ng/m^3) vergleichbar ist. Neben Me_3As konnte in beiden Proben der Anlage B auch MeAsH_2 in geringen Konzentrationen (17 bzw. 34 ng/m^3) detektiert werden. Für diese Spezies waren allerdings die Konzentrationen in Probe 2 höher als in Probe 1, was auf die höhere Flüchtigkeit dieser Spezies zurückzuführen ist. In der gleichen Probe (Probe 1, Anlage B) treten weitere Signale im Bereich zwischen 200 und 800 Sekunden auf, welche aber sehr unspezifisch sind und keiner Arsenspezies zugeordnet werden können. Auch in den Chromatogrammen der anderen Anlagen (Abbildung 24) finden sich weitere, unbekannte Arsenverbindungen, welche mit einer Retentionszeit >350 Sekunden von der Säule eluieren, aber keine eindeutigen Signale ergeben. Es sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, dass Probe 1 der Anlage C aufgrund eines defekten Gasprobenbeutels nicht analysiert werden konnte.

Deutlich sichtbar sind in den Chromatogrammen der Anlagen C und D auch die Artefakte am Anfang (Retentionszeit 53 Sekunden) und am Ende der Messung (starker Anstieg im Chromatogramm ab etwa 900 Sekunden), auf die in Kapitel 1.4.1.5 (Seite 86) nochmals eingegangen werden soll.

Tabelle 13: Konzentration der quantifizierten Arsenspezies im Biogas der Anlagen A bis D.

Spezies (ng/m^3)	Anlage A		Anlage B		Anlage C	Anlage D	
	Probe 1	Probe 2	Probe 1	Probe 2	Probe 2	Probe 1	Probe 2
Me_3As	45	50	694	40	67	38	31
MeAsH_2	n.n.	n.n.	17	34	n.n.	n.n.	n.n.

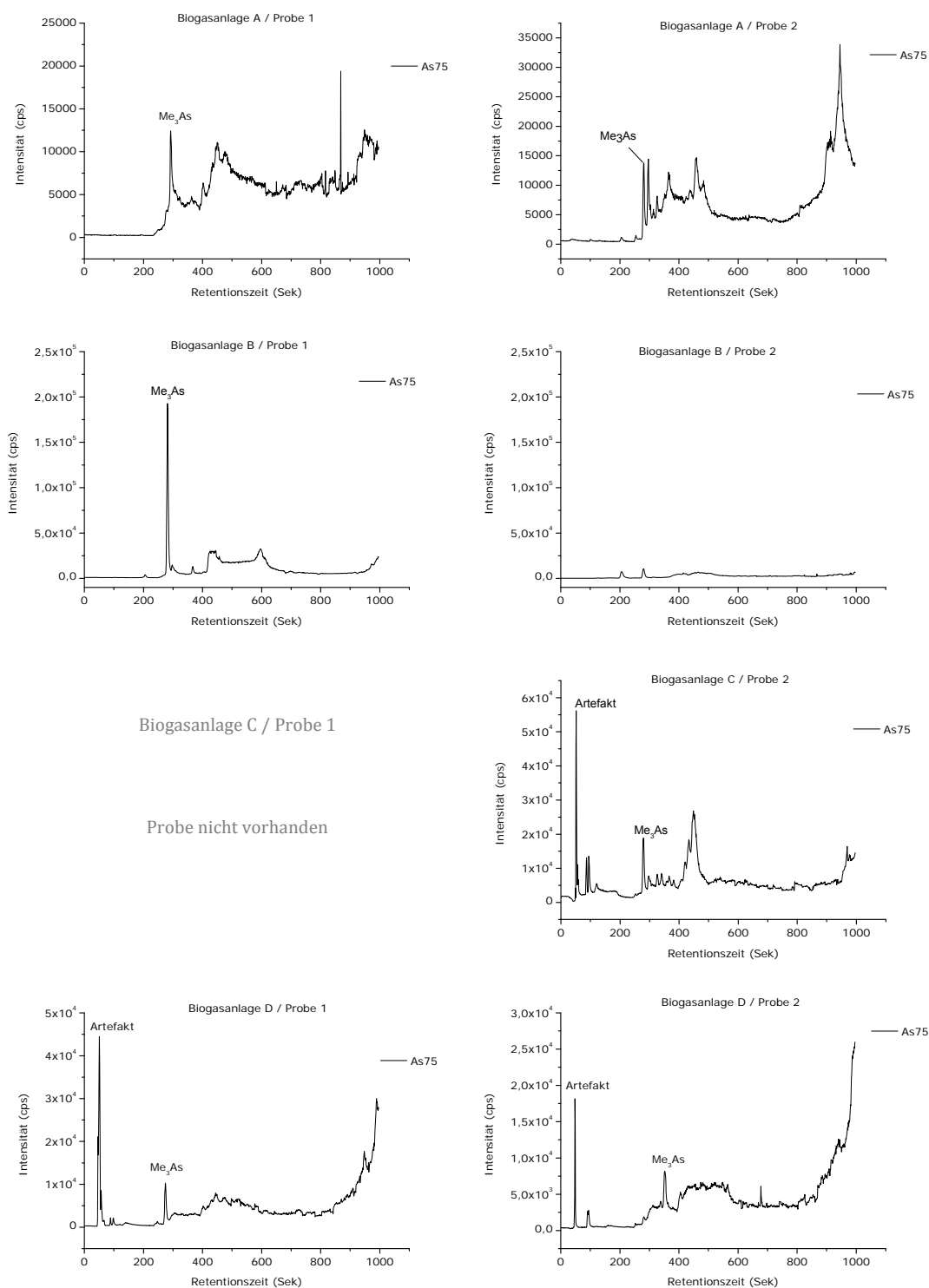


Abbildung 24: Chromatogramme der Arsen - Speziesanalyse im Biogas der Anlagen A bis D.

1.4.1.2 Antimonspezies

In beiden Proben der Anlage A konnte Trimethylantimon (Me_3Sb) in etwa gleicher Konzentration nachgewiesen werden (siehe Abbildung 26). Während in Probe 1 bei einer Retentionszeit von 500 bis 900 Sekunden ein sehr unspezifisches Antimonsignal auftritt, ist dieses Signal in Probe 2 nicht mehr vorhanden. Stattdessen ist in dieser Probe ein zusätzlicher, scharfer Antimonpeak einer unbekannten Spezies mit einer Retentionszeit von 946 Sekunden zu erkennen.

In den Proben der Anlage B zeigte sich, wie bereits zuvor beim Arsen, auch beim Antimon eine fast 20-fach höhere Konzentration an Trimethylantimon (Me_3Sb) in Probe 1 im Vergleich zu Probe 2. Ein Signal für Me_3Sb ist hier nur noch bei starker Vergrößerung des Chromatogramms zu erkennen.

Besonders in den Proben der Anlagen C und D treten neben Me_3Sb im Bereich der Retentionszeit zwischen 300 und 600 Sekunden weitere, verschiedene, nicht spezifische Antimonspezies auf. Auffallend ist zudem ein weiteres starkes Signal am Ende der Chromatogramme der Anlage D. Allerdings konnte dieses aufgrund der gewählten Methode / Messzeit nicht mehr vollständig erfasst werden. Hier muss für folgende Untersuchungen die Analysenzeit verlängert werden um auch später eluierende Spezies zu erfassen.

Die speziesanalytische Untersuchung des Biogases der Anlagen C und D auf Antimonspezies zeigte ebenfalls das bereits beschriebene Artefakt zu Beginn der Chromatogramme.

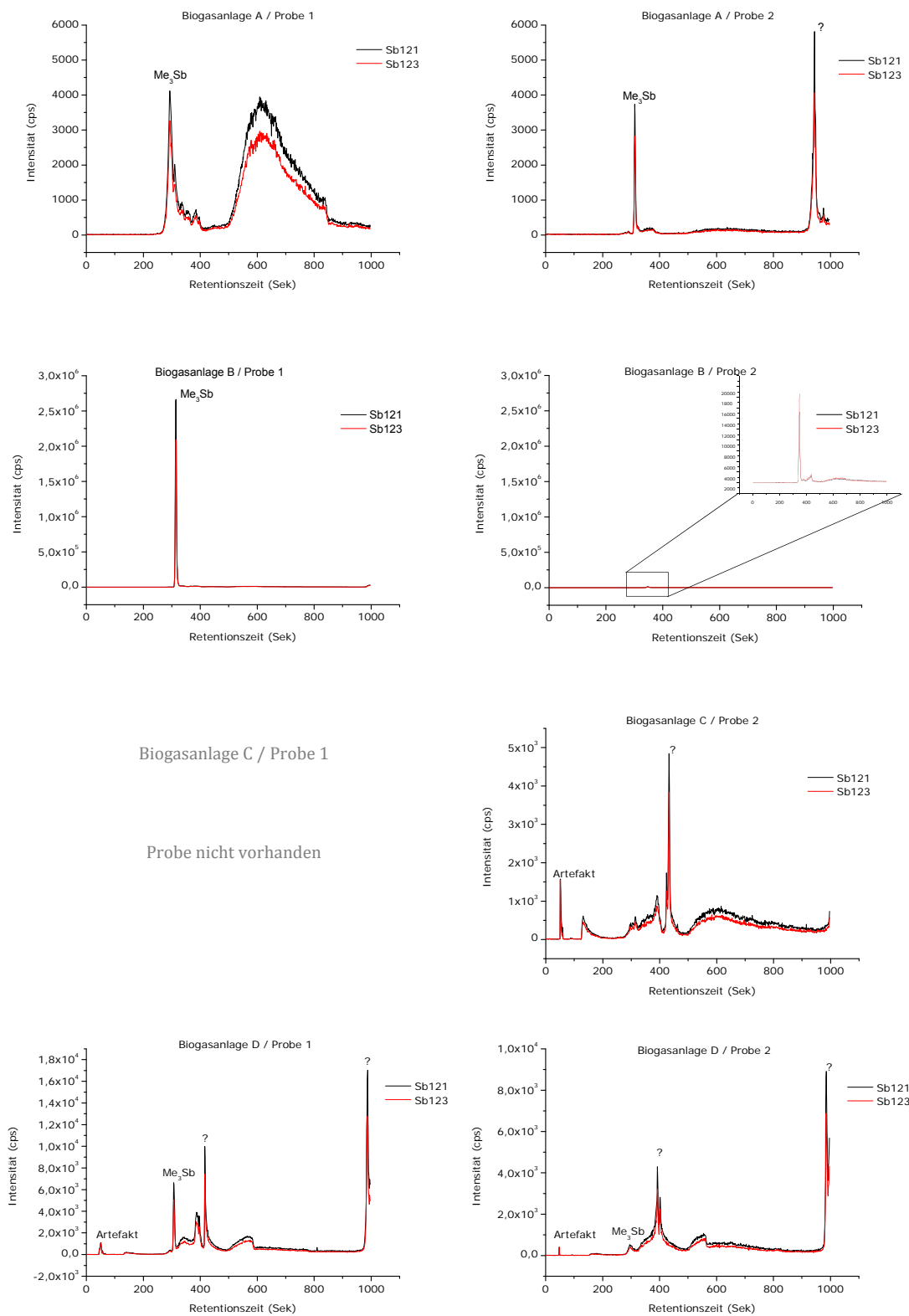


Abbildung 25: Chromatogramme der Antimon - Speziesanalyse im Biogas der Anlagen A bis D.

1.4.1.3 Quecksilberspezies

In beiden Proben der Anlage A konnte etwas weniger als 400 ng elementares Quecksilber (Hg^0) pro Kubikmeter Biogas nachgewiesen werden (Abbildung 26). In Probe 2 waren zudem Spuren der Spezies Dimethylquecksilber (Me_2Hg) detektierbar. Für eine Quantifizierung reichten diese Spuren jedoch nicht aus. Im Gegensatz zu Arsen und Antimon wurde in Anlage B bei der Quecksilberkonzentration nur ein Faktor von etwa 6 zwischen Probe 1 und Probe 2 festgestellt. Auch hier war Hg^0 und nicht das Dimethylquecksilber die vorherrschende Spezies. In der zweiten Probe konnte vor dem Signal des elementaren Quecksilbers ein weiterer Peak mit einer Retentionszeit von 144 Sekunden detektiert werden. Diese Spezies muss, wenn es sich nicht um ein Artefakt handelt, einen geringeren Siedepunkt bzw. höheren Dampfdruck als das elementare Quecksilber aufweisen; zum Beispiel in Form von Hydriden. Allerdings sind diese für Quecksilber (HgH_2) nur in fester Form bekannt, nicht besonders stabil und zerfallen bereits bei Temperaturen oberhalb von -125°C (Wiberg *et al.*, 1951). Allerdings kann HgH_2 durchaus bei der Hydridgenerierung gebildet werden (Sturgeon *et al.*, 2002). Und auch Shayesteh *et al.* wollen eine Bildung von HgH_2 aus Hg^{II} in der Umwelt unter bestimmten Bedingungen oder durch Mikroorganismen nicht ausschließen (Shayesteh *et al.*, 2005). Somit ist auch hier nicht auszuschließen, dass diese Verbindung tatsächlich in Biogasanlagen entstehen kann. Allerdings ist es erstaunlich, dass diese Spezies bis zum analytischen Nachweis stabil ist. Abgesehen von der Probe 2 der hier beschriebenen Biogasanlage B war diese Spezies in keiner anderen Biogasprobe nachweisbar. Aufgrund der Signalthöhe des Artefaktes mit einer Retentionszeit von 51 Sekunden in Probe 2 der Anlage C erscheint der Peak des Hg^0 im Chromatogramm extrem klein, reicht für eine Quantifizierung aber dennoch aus. Somit ergibt sich hier eine Quecksilberkonzentration von 28 ng/m^3 . In Anlage D konnten zwei Spezies (Hg^0 und Me_2Hg) im Biogas detektiert werden. Auch hier war in Probe 1 wieder eine höhere Konzentration feststellbar. Dimethylquecksilber war nur in nicht quantifizierbaren Spuren nachweisbar.

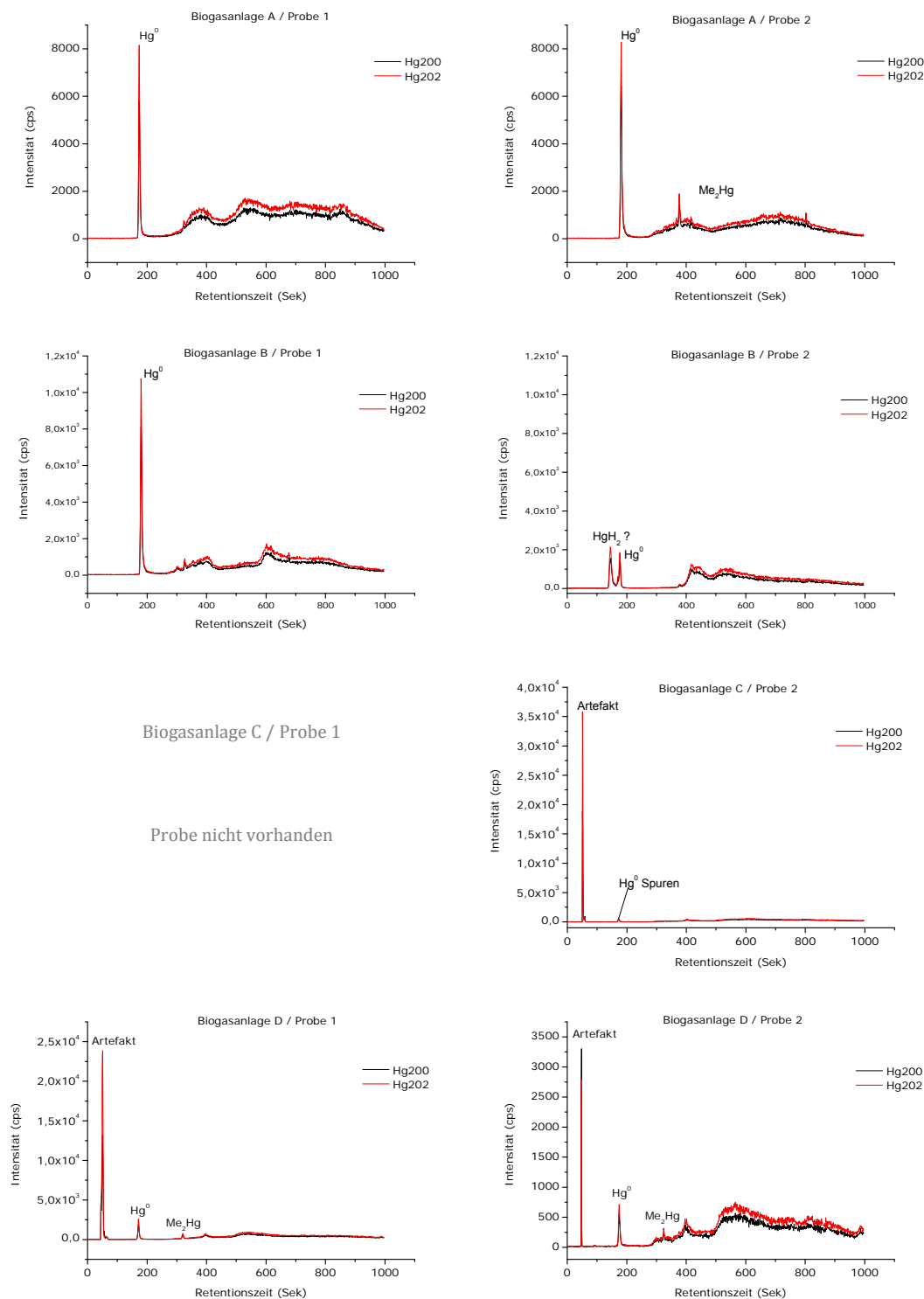


Abbildung 26: Chromatogramme der Quecksilber - Speziesanalyse im Biogas der Anlagen A bis D.

1.4.1.4 Zinnspezies

Die Chromatogramme in Abbildung 27 zeigen die Massenspuren des Zinns (^{118}Sn und ^{120}Sn) für die jeweiligen Proben der Biogasanlagen A bis D.

In beiden Biogasproben der Anlage A konnte Tetramethylzinn (Me_4Sn) mit einer Retentionszeit von 314 Sekunden nachgewiesen werden. Während in Probe 1 dieser Anlage keine weitere Spezies nachweisbar war, trat in Probe 2 mit einer Retentionszeit von 946 Sekunden ein weiteres Signal auf, welches allerdings bisher nicht identifiziert werden konnte.

Wie bereits zuvor für Arsen, Antimon und Quecksilber, so konnte auch bei der Analyse der Massenspur des Zinns in Probe 1 der Anlage B ein wesentlich höherer Me_4Sn Gehalt gegenüber der zweiten Probe dieser Anlage ermittelt werden, was leicht an den unterschiedlichen Signalhöhen in Abbildung 28 nachvollziehbar ist. Die Quantifizierung ergab hier Konzentrationen von 79 bzw. 20 ng Me_4Sn pro Kubikmeter Biogas.

In den Chromatogrammen der Proben aus den Anlagen C und D ist auch in den Massenspuren des Zn wieder das bereits zuvor beschriebene Artefakt bei einer Retentionszeit von 53 Sekunden deutlich sichtbar. Als Zinnspezies konnten in diesen beiden Anlagen aber lediglich Spuren des permethylierten Tetramethylzinn detektiert werden.

Sowohl Probe 1 als auch Probe 2 der Anlage D zeigen kurz vor 1000 Sekunden ein weiteres Signal, welches aufgrund der späten Retentionszeit auf höhersiedende Zinnspezies hindeutet. Denkbar sind hier z.B. Butylzinnverbindungen, welche auch in Klärschlämmen nachgewiesen werden können.

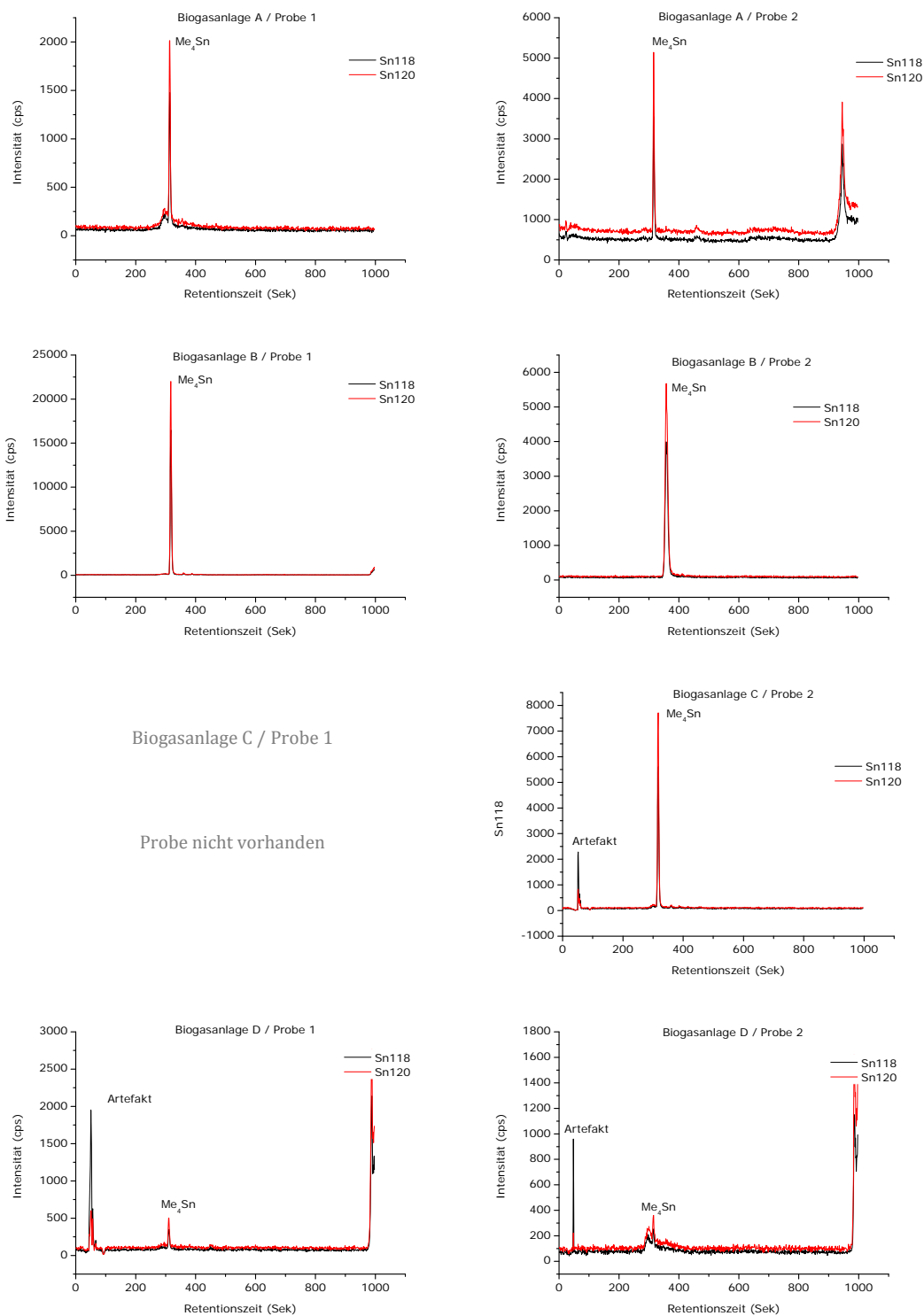


Abbildung 27: Chromatogramme der Zinn - Speziesanalyse im Biogas der Anlagen A bis D.

1.4.1.5 Zusammenfassung Biogas

In allen Biogasanlagen (A bis D) konnten verschiedene permethylierte Spezies nachgewiesen werden. In Tabelle 14 sind die quantifizierten Spezies dieser Anlagen nochmals zusammenfassend aufgelistet.

Tabelle 14: Übersicht über die Konzentration nachgewiesener leicht flüchtiger Metall(oid)spezies im Biogas der Anlage B.

Spezies (ng/m ³)	Anlage A		Anlage B		Anlage C	Anlage D	
	Probe 1	Probe 2	Probe 1	Probe 2	Probe 2	Probe 1	Probe 2
Me ₃ As	45	50	694	40	67	38	31
MeAsH ₂	n.n.	n.n.	17	34	n.n.	n.n.	n.n.
Hg ^o	393	398	519	89	28	124	35
Me ₂ Hg	n.n.	Spuren	n.n.	n.n.	n.n.	Spuren	Spuren
Me ₄ Sn	19	7	79	20	28	2	Spuren

Besonders bei der Analyse der Biogasproben aus Anlage B zeigten sich erhebliche Unterschiede in den Proben 1 und 2. Generell war für alle Elemente die Konzentration in der Probe 1 um ein Vielfaches (bis zu 20-fach) höher als in Probe 2. Dies kann auf die Bedingungen bei der Probennahme zurückgeführt werden (siehe auch spezieller Teil, Kapitel 1.5, Seite 116). Wie bereits in Kapitel 1.2 (spezieller Teil, Seite 67) beschrieben, war hier die Installation eines behelfsmäßigen Probennahmeanschlusses notwendig. Aufgrund der gegebenen Bedingungen (Explosionsgefahr) war es nicht möglich, die Probennahmeleitung vor der Probennahme mit größeren Volumina des Biogases zu spülen, sodass gerade bei der Entnahme der ersten Probe an dieser Stelle abgelagerte Substanzen / Spezies in die Probe gelangten.

Auffällig ist in allen Chromatogrammen der Anlagen C und D ein Signal mit einer Retentionszeit von 53 Sekunden. Dieses Signal ist auch im mitgeführten Rhodi-

umstandard vorhanden und deutet daher auf ein Artefakt und nicht auf eine Elementspezies hin. Bestätigt wird diese Vermutung durch eine genauere Betrachtung des Chromatogramms der Zinnspezies in Probe 1 der Anlage C (Artefakt-Peak bei 53 Sekunden). Die Massenspuren zeigen, dass hier das Signal für ^{118}Sn deutlich über dem des ^{120}Sn liegt. Mit einem natürlichen Isotopenverhältnis von ^{118}Sn (24,2%) zu ^{120}Sn (32,6%) von 1:1,3 wäre allerdings ein um etwa ein Drittel höheres Signal für das Isotop ^{120}Sn zu erwarten, wie es auch bei der identifizierten Me_4Sn Spezies der Fall ist. Auch im Artefakt des Quecksilbersignals (Abbildung 26, Seite 83) entspricht das Verhältnis der Signalhöhen nicht dem natürlichen Isotopenverhältnis von ^{200}Hg zu ^{202}Hg . Da dieses Signal somit mit gleicher Retentionszeit bei verschiedenen Elementen, als auch im Standard vorhanden ist und die Isotopenverhältnisse nicht übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine Störung / ein Artefakt und nicht um weitere Spezies handelt.

Der Signalanstieg am Ende einiger der oben abgebildeten Chromatogramme (insbesondere beim Arsen) ist auf Interferenzen durch die Probenmatrix zurückzuführen. Im Rhodiumstandard ist dieser Anstieg, im Unterschied zum zuvor beschriebenen Artefakt bei 53 Sekunden, allerdings kaum zu erkennen.

Im Gegensatz zu den anderen Metall(oid)en, welche hauptsächlich als permethylierte Spezies nachgewiesen wurden, ist beim Quecksilber das Hg^0 die dominierende Spezies, was weiter hinten in Kapitel 1.5 (spezieller Teil, Seite 116) nochmals aufgegriffen und diskutiert werden soll.

In vielen Proben, so u. a. beim Antimon und Zinn, konnten Spuren weiterer hochsiedender Spezies in den Chromatogrammen detektiert werden. Für eine Identifizierung oder gar eine Quantifizierung reichten die Konzentrationen allerdings nicht aus bzw. wären z.B. EI-Massenspektren notwendig.

1.4.2 Gesamtquecksilbergehalte im Anmaischbecken, Nachgärer und Kondensat

Die Bestimmung der Quecksilbergehalte erfolgte mittels des „Direct Mercury Analyzers“ (siehe allgemeiner Teil, Kapitel 3.1, Seite 38). Die Gesamtquecksilbergehalte in den Anmaischbecken, Nachgärern sowie im Gaskondensat sind in Tabelle 15 zusammengefasst und graphisch in der nachfolgenden Abbildung 28 dargestellt. Angegeben ist der Gesamtquecksilbergehalt (Hg_{ges}) nach Dreifachbestimmung in $\mu g/kg$.

Tabelle 15: Gesamt Hg-Gehalte in den Anmaischbecken, Nachgärern und Gas-Kondensaten der Biogasanlagen A bis D

Probe	Hg_{ges} [$\mu g/kg$]			
	Anlage A	Anlage B	Anlage C	Anlage D
Anmaischbecken	$4,2 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,3$
Nachgärer	$3,6 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$
Kondensat	$2,5 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,7$	$1,9 \pm 0,2$

Auf eine Bestimmung und einen Bezug der Quecksilbergehalte auf die Trockensubstanz der Proben wurde zunächst verzichtet, da auch die spätere Speziesbestimmung in den flüssigen Phasen bzw. auch die Hydridgenerierung in der vollständigen, homogenisierten Matrix erfolgte.

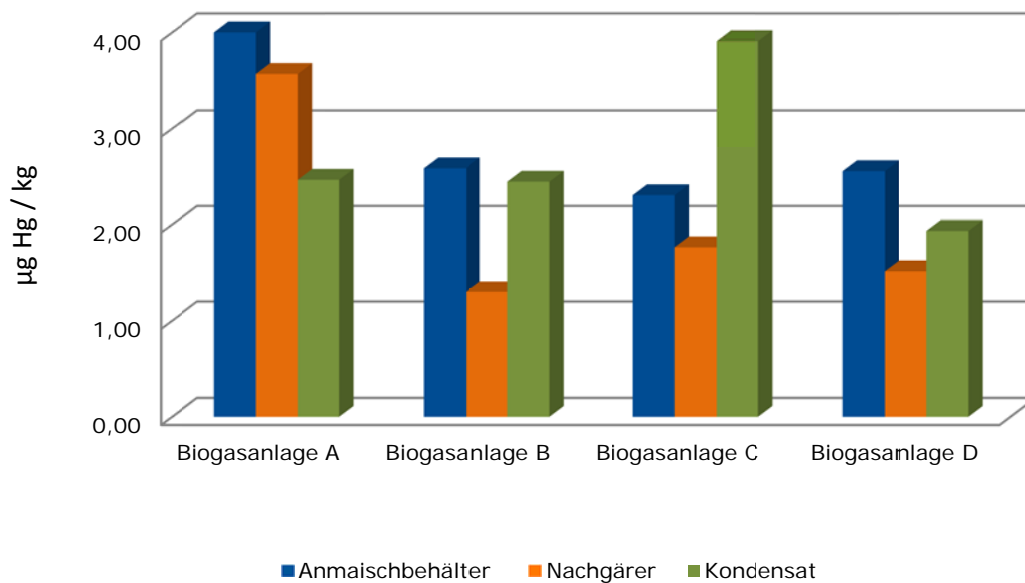


Abbildung 28: Gesamtquecksilbergehalte (µg/kg) in Anmischbecken, Nachgärern und Gaskondensaten aus den Biogasanlagen A bis D

Wie aus Abbildung 28 ersichtlich, liegen die Hg Konzentrationen in den Nachgärern bei allen Biogasanlagen unter denen der Anmischbecken. Teile des Quecksilbers (15% bis 50%) gelangen so ins Biogas bzw. werden im Kondenswasser zurückgehalten. Im Kondenswasser selber liegen die Konzentrationen zwischen 2 und 4 µg Hg/kg. Auch im Biogas (nach dem Kondensator) konnte, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, Quecksilber im Konzentrationsbereich von 28 bis 519 ng/m³ nachgewiesen werden.

Zum Vergleich der ermittelten Hg-Gehalte mit Literaturwerten wurden diese Werte dennoch (auch wenn sie für den späteren Bezug auf die Speziesbestimmung nicht notwendig waren) auf die Trockensubstanz bezogen.

Tabelle 16: Gesamt Hg-Gehalte verschiedener in der Biogasproduktion eingesetzter Substrate, bezogen auf die Trockensubstanz.

Substrat	Hg (µg / kg TS)
Rindergülle	50
Schweinegülle	40
Geflügelmist	50
Bioabfallkompost	240
Ernterückstände	70

(Kranert, 2001)

Hierbei ergaben sich Hg-Konzentrationen im Bereich zwischen 26 und 84 µg Hg/kg Trockensubstanz. Ein Vergleich dieser Werte mit den Literaturwerten für Quecksilber in verschiedenen, vergleichbaren Substraten zeigt eine gute Übereinstimmung der ermittelten Konzentrationen mit den Literaturwerten (Tabelle 16). Lediglich für Anlage B lag für ein Gär-

produkt ein Prüfbericht vor, in dem auch Quecksilber als Prüfparameter aufgeführt war. Hier wurde für dieses Element in der Trockensubstanz ebenfalls ein Wert von < 50µg/kg ermittelt (Landeswirtschaftskammer NRW, 2011). Ein direkter Vergleich der Messwerte ist verständlicherweise nicht möglich, da die Probe aus dem Prüfbericht nicht mit der aktuell aus dem Gärprozess entnommenen Probe übereinstimmen kann (stark schwankende Einsatzmaterialien).

1.4.3 Speziesbestimmung (As, Sb, Hg) in Anmaischbecken, Nachgärern und Kondensaten von Biogasanlagen (Hydridgenerierung)

Zur Speziesbestimmung wurden die Proben der Biogasanlagen A bis D zunächst derivatisiert (Hydridgenerierung) und mittels GC/ICP-MS analysiert (Kapitel 1.3.3, Seite 73). Die Hydridgenerierung ist generell eine exzellente Methode zur Trennung von Arsen- und Antimonverbindungen in verschiedenen Matrices (Campbell, 1992). Bei den Proben aus den Anmaischbecken sowie den Proben aus den Nachgärern handelte es sich allerdings um extrem heterogene Proben mit zum Teil hohen Fettanteilen. Diese hohen Fettgehalte haben einen starken Einfluss auf die Derivatisierungseffizienz. Es ist kaum sicherzustellen, dass alle Spezies komplett erfasst werden konnten. Die angegebenen Werte sind daher als Screening der Speziesverteilung anzusehen und müssen später unbedingt mit den ermittelten Gesamtmetallgehalten, die momentan nur für Quecksilber vorliegen (siehe Fußnote 13, Seite 76), verglichen werden.

Wie oben beschrieben wurden diese Proben zunächst homogenisiert und anschließend mittels Dreifachbestimmung analysiert. In den folgenden Kapiteln sind jeweils repräsentative Chromatogramme der Messungen aufgeführt.

Gerade Arsenspezies können nur bedingt mittels Hydridgenerierung nachgewiesen werden. Eine Unterscheidung zwischen drei- und fünfwertigen (methylierten) Arsenspezies ist unter stark reduzierenden Bedingungen nicht möglich bzw. stark pH-Wert abhängig (Carrero *et al.*, 2001). Nach der Derivatisierung werden die Arsenspezies als Hydride (Massenspur ^{75}As) mittels ICP-MS detektiert. Sowohl dreiwertige, als auch fünfwertige (methylierte) Arsenspezies werden unter gegebenen Analysebedingungen als entsprechende dreiwertige Hydride detektiert, wobei anorganisches Arsen (iAs) zu AsH_3 , Monomethylarsenverbindungen zu MeAsH_2 und Dimethylarsenverbindungen zu Me_2As derivatisiert (Abbildung 29) werden.

Zur weiteren Speziierung des Arsens wurde daher zusätzlich eine HPLC/ICP-MS Analyse der wässrigen Phasen (nach Filtration der Proben) aus den Anmaisch-

becken, Nachgären und Kondensaten durchgeführt (siehe spezieller Teil, Kapitel 1.4.4, ab Seite 109).

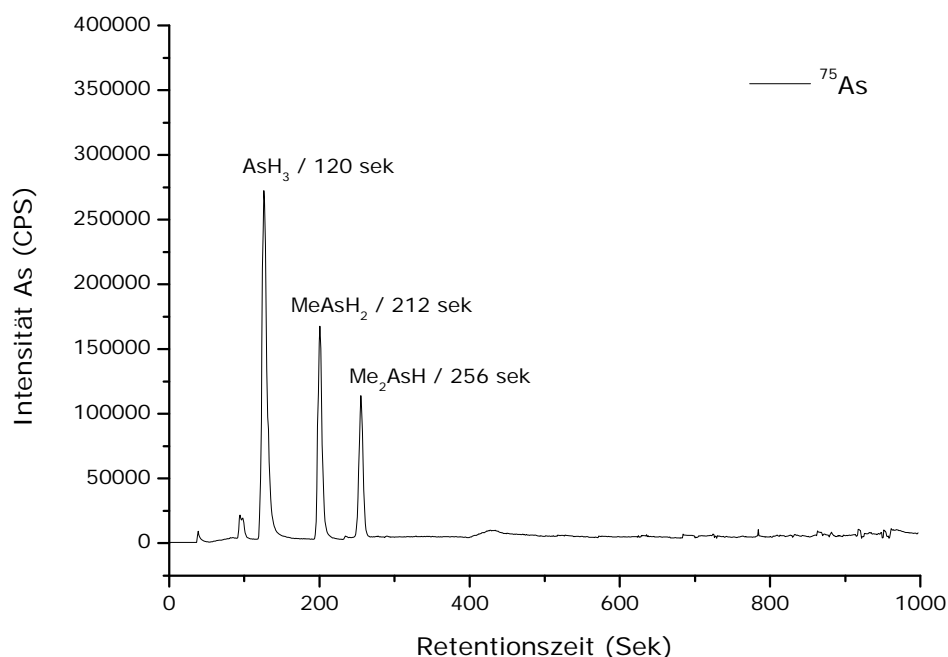


Abbildung 29: Typisches Chromatogramm (GC-ICP-MS; $m/z=75$) eines Arsenstandards mit iAs(III), iAs(V), MeAs(III), MeAs(V), Me₂As(III) nach Derivatisierung (Hydrierung). Die fünfwertigen As-Verbindungen wurden zum dreiwertigen Hydrid reduziert.

1.4.3.1 Anmaischbecken - Speziesbestimmung (As, Sb, Hg / Hydridgenerierung)

Arsen (As) – Speziesbestimmung (Anmaischbecken)

In allen Proben der Anmaischbecken konnten neben anorganischem Arsen auch methylierte Arsenspezies (Mono-, Di- und Trimethylarsen) nachgewiesen werden (Abbildung 30). Anlage A fiel im Vergleich mit den anderen Anlagen durch eine wesentlich höhere Konzentration an anorganischem Arsen (iAs) auf. Während in den Anlagen A, B und D das anorganische Arsen die Hauptspezies

darstellt, ist das Arsen in Anlage C zum Großteil als monomethylierte Spezies anzutreffen. Di- und trimethylierte Spezies finden sich, außer in Anlage A in der das Dimethylarsen die zweithäufigste Spezies darstellt, nur in geringen Konzentrationen.

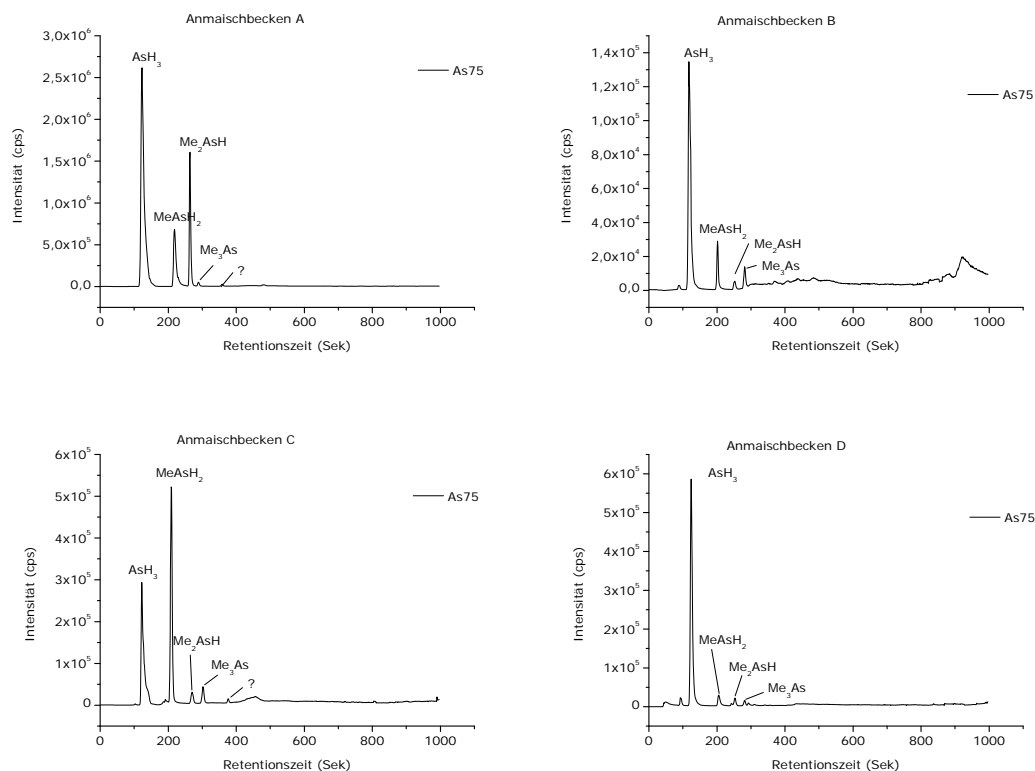
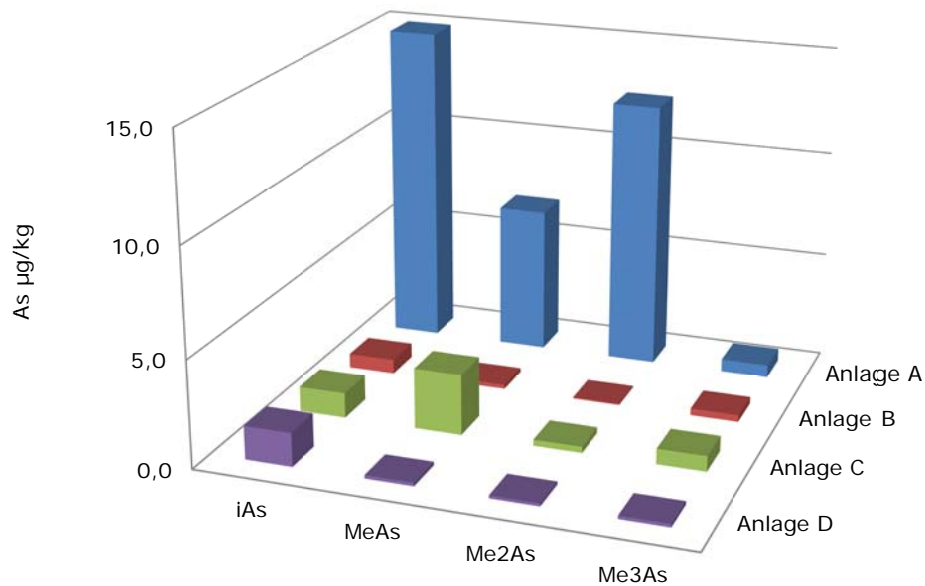


Abbildung 30: Arsen - Speziesanalyse in Anmaischbecken A – D nach Derivatisierung

Die quantifizierten Werte der einzelnen Arsenspezies sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Mit einer Retentionszeit von 365 Sekunden konnte in den Biogasanlagen A und C eine weitere, unbekannte Arsenspezies (in den Chromatogrammen in Abbildung 30 mit (?) gekennzeichnet) nachgewiesen werden. Die Vermutung, dass es sich hierbei um eine methylierte Thiospezies handelt, konnte durch eine Korrelation mit der ebenfalls gemessenen Massespur des Schwefels ($m/z=34$) nicht bestätigt werden; zum Retentionszeitpunkt der unbekannten Arsenspezies ist kein

Tabelle 17: Quantifizierte As-Spezies im Anmaischbecken der Biogasanlagen A bis D



As µg/kg	Anlage A	Anlage B	Anlage C	Anlage D
iAs	16	0,7	1,2	1,6
MeAs	6,8	0,2	2,8	0,2
Me ₂ As	13	0,1	0,3	0,1
Me ₃ As	0,6	0,3	0,7	0,2

Schwefelsignal detektierbar (Abbildung 31). Dies kann aber eine Folge der geringen Nachweisempfindlichkeit des Schwefels bei der durchgeführten Messmethode sein, was bei weiteren Messungen durch Verwendung einer Reaktionszelle (Bildung und Detektion von SO₂) überprüft werden kann.

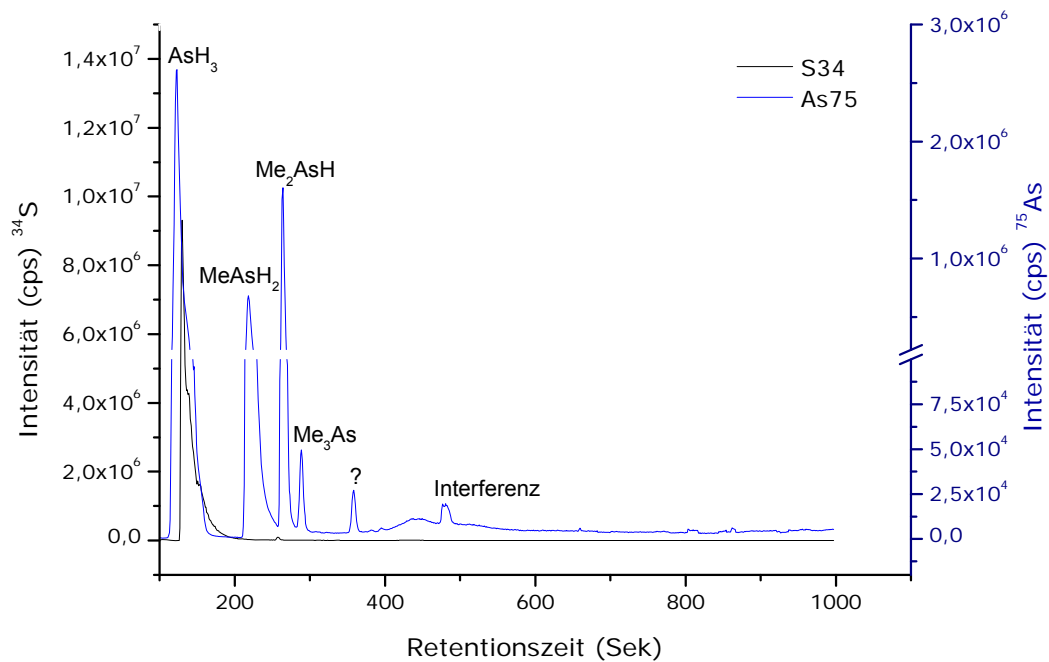


Abbildung 31: Massenspektren von ^{75}As und ^{34}S in einer Messung des Anmischbeckens (Anlage A) nach Derivatisierung. Eine Korrelation zwischen den As und S – Spuren ist nicht zu erkennen.

Antimon (Sb) – Speziesbestimmung (Anmischbecken)

Wie bereits beim Arsen konnte auch Antimon in allen Anmischbecken in anorganischer Form (als AsH_3 , aufgrund der Derivatisierung) nachgewiesen werden, wobei es in den Anlagen B bis D die Hauptspezies darstellte. Methylierte Sb-Spezies fanden sich sowohl im Becken A als auch in den Becken C und D. Im Anmischbecken A stellte die monomethylierte Spezies (MeSb) die am häufigsten vorkommende Sb-Spezies dar (Abbildung 32).

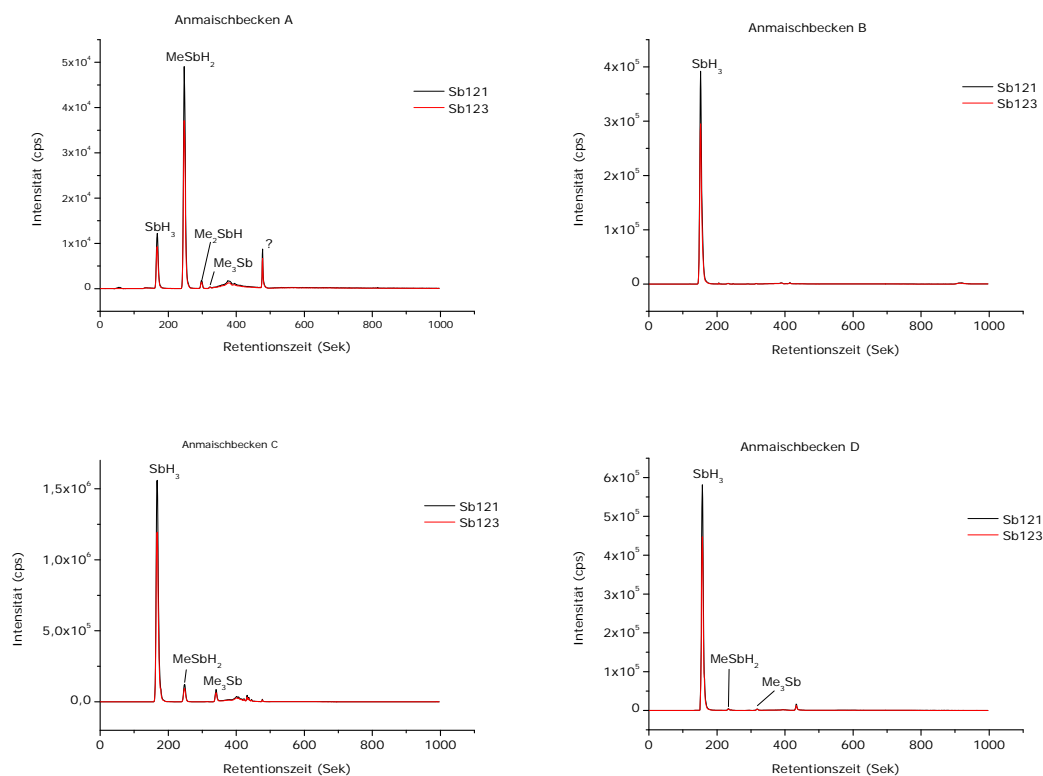


Abbildung 32: Antimon - Speziesanalyse in Anmaischbecken A – D nach Derivatisierung

Mehrfach methylierte Antimonspezies traten nur in geringen Konzentrationen auf. In Anlage A konnte aber neben den mono-, di- und trimethylieren Spezies eine weitere, unbekannte Verbindung mit einer Retentionszeit von 480 Sekunden nachgewiesen werden, welche in Spuren auch in Anlage C vorzufinden war.

Quecksilber (Hg) – Speziesbestimmung (Anmaischbecken)

Die Quecksilberspeziesanalysen der Proben aus den Anmaischbecken zeigten recht unterschiedliche Ergebnisse. Während in den Proben aus den Anlagen A und B ein Großteil des Quecksilbers in unbekannter Form vorliegt, was sich in den Chromatogrammen in sehr unspezifischen Signalen bei Retentionszeiten größer 400 Sekunden darstellt, finden sich in den Anlagen C und D große Mengen Monomethylquecksilber (Abbildung 33).

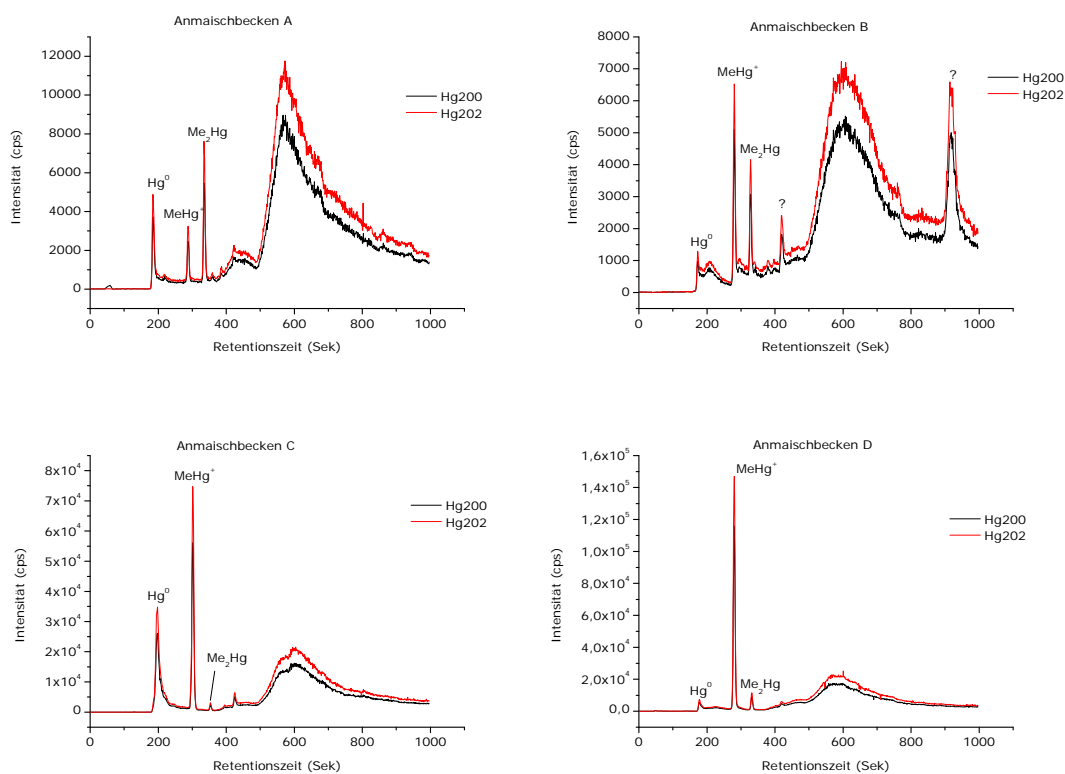


Abbildung 33: Quecksilber - Speziesanalyse in Anmaischbecken A – D nach Derivatisierung

Die Konzentrationen der quantifizierten Quecksilberspezies (Hg^0 , MeHg , Me_2Hg) sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Da für die unbekannten Hg-Verbindungen keine Standards zur externen Kalibration zur Verfügung stehen, wurde zur Abschätzung der Konzentrationen dieser Spezies eine zu Me_2Hg vergleichbare Ionisierungseffizienz und Kalibrationsgerade angenommen und diese Spezies so

semiquantitativ bestimmt. Beim Vergleich der durch die Aufsummierung der einzelnen Spezies ermittelten Gesamtkonzentration mit der mittels AAS ermittelten Hg-Konzentration (Kapitel 1.4.2) zeigt sich eine recht ordentliche Übereinstimmung der Analysenergebnisse für die Anlagen C und D. Ist der Anteil der unbekannten Spezies zu hoch und somit die Signale in den Chromatogrammen zu unspezifisch (Anlagen A und B), so bleibt die Summe der einzelnen, detektierten Hg-Spezies erheblich hinter dem ges. Quecksilbergehalt zurück (Tabelle 18).

Tabelle 18: Quantifizierte Hg-Spezies im Anmaischbecken der Biogasanlagen A bis D

Hg µg/kg	Anlage A	Anlage B	Anlage C	Anlage D
Hg°	0,06	0,04	0,17	0,03
MeHg	0,37	0,47	1,48	2,16
Me ₂ Hg	0,05	0,03	0,00	0,01
?Hg	1,73*)	0,95*)	<0,01*)	<0,01*)
Summe	2,21	1,48	1,66	2,20
Ges. Hg**)	4,2	2,6	2,3	2,6

*) semiquantitative Konzentrationsbestimmung

**) aus Kapitel 1.4.2

1.4.3.2 Nachgärer - Speziesbestimmung (As, Sb, Hg / Hydridgenerierung)

Arsen (As) – Speziesbestimmung (Nachgärer)

Allgemein sind die Arsenspezieskonzentrationen in den Nachgärern wesentlich geringer als in den Anmaischbecken bzw. sind wie in Anlage A und D gar nicht oder nur noch in nicht quantifizierbaren Spuren nachweisbar (Abbildung 34). Gerade Anlage A, in deren Anmaischbecken die höchsten Arsenspeziesbelastungen nachgewiesen wurden, zeigt im Nachgärer nahezu kein Arsen mehr.

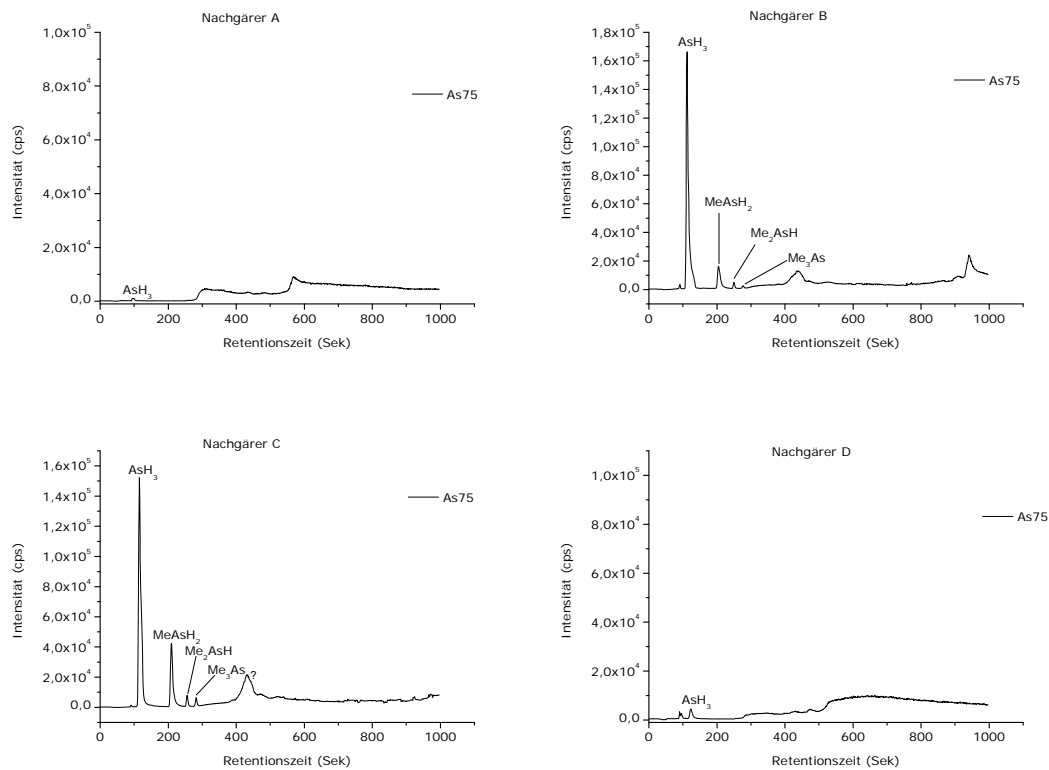
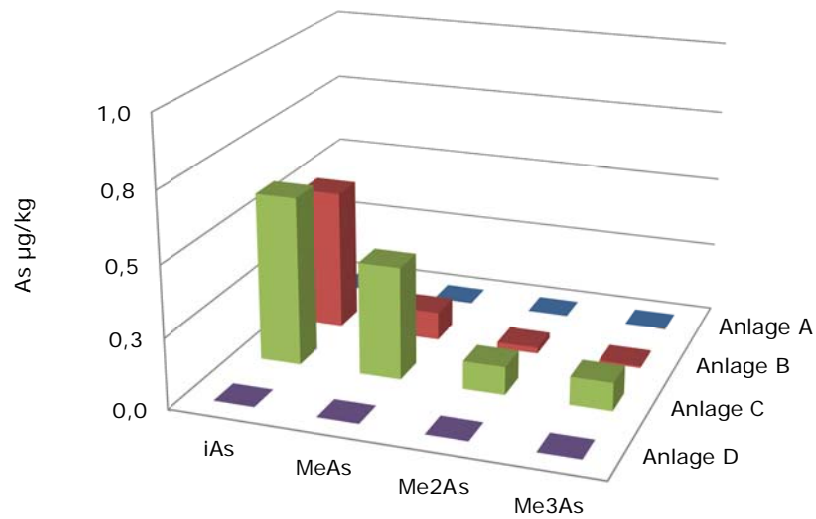


Abbildung 34: Arsen - Speziesanalyse in Nachgärern A - D nach Derivatisierung

In den Anlagen, in denen noch Arsenspezies nachweisbar waren, ist eine deutliche Abnahme der Spezies mit ihrem Methylierungsgrad zu erkennen (Abbildung 34).

Die quantifizierten Werte der einzelnen Arsenspezies sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Quantifizierte As-Spezies im Nachgärer der Biogasanlagen A bis D



As µg/kg	Anlage A	Anlage B	Anlage C	Anlage D
iAs	n.n.	0,5	0,6	n.n.
MeAs	n.n.	0,1	0,4	n.n.
Me ₂ As	n.n.	n.n.	0,1	n.n.
Me ₃ As	n.n.	n.n.	0,1	n.n.

Antimon (Sb) - Speziesbestimmung (Nachgärer)

Vom Antimon konnten, wie zuvor beim Arsen, keine methylierten Spezies in den Nachgärern der Anlagen A und D nachgewiesen werden. Wie in den Anmaischbecken war auch in den Nachgärern fast ausschließlich anorganisches Antimon nachweisbar. Lediglich in den Nachgärern der Anlagen B und D fanden sich Spuren von Monomethylantimon (MeSb) sowie Spuren unbekannter Antimonverbindungen mit Retentionszeiten von 433 bzw. 973 Sekunden (Abbildung 35).

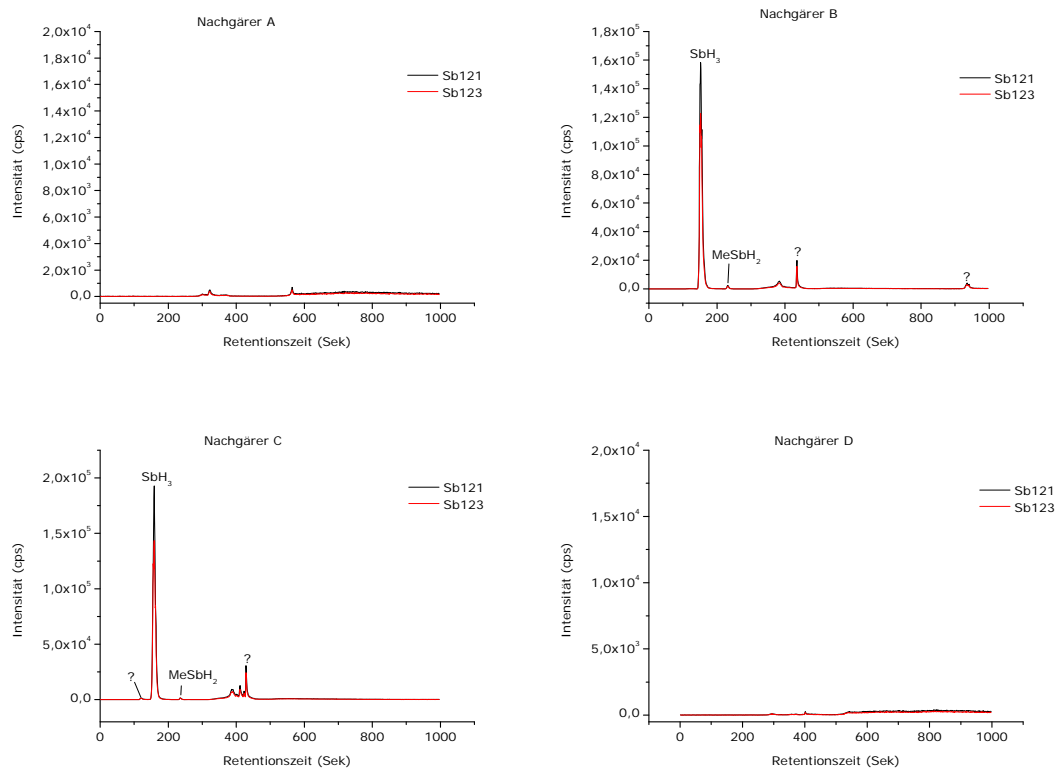


Abbildung 35: Antimon - Speziesanalyse in Nachgärern A – D nach Derivatisierung

Quecksilber (Hg) - Speziesbestimmung (Nachgärer)

Erwartungsgemäß lagen die Quecksilberspezieskonzentrationen in den Nachgärern unterhalb der Konzentrationen in den Anmaischbecken, wie es auch bei Betrachtung der zuvor durchgeführten ges. Hg Analysen (spezieller Teil, Kapitel 1.4.2, Seite 88) zu erwarten war. Auffallend ist, dass Monomethylquecksilber (MeHg), welches in den Anmaischbecken noch als eine der Hauptspezies identifiziert wurde, in keinem der untersuchten Nachgärern nachweisbar war (Abbildung 36).

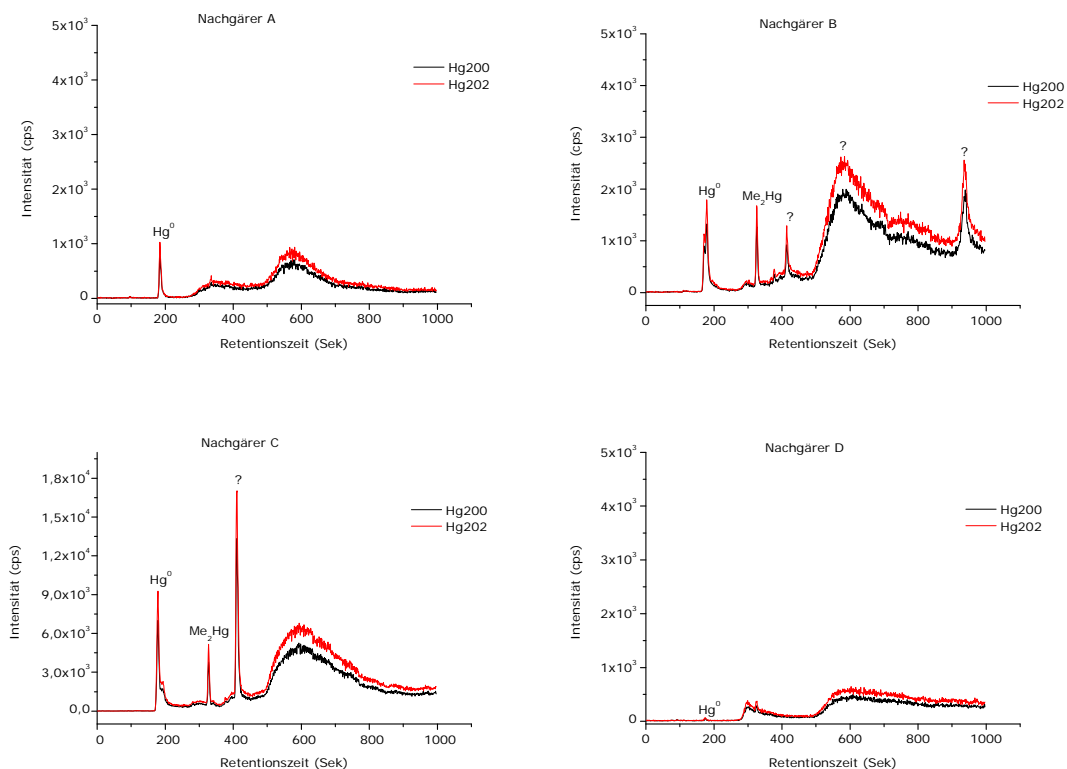
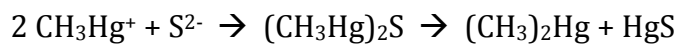


Abbildung 36: Quecksilber - Speziesanalyse in Nachgärern A – D nach Derivatisierung

Besonders auffällig ist dies für Anlage D. Hier wurde im Anmaischbecken nahezu ausschließlich MeHg nachgewiesen. Im Nachgärer ist für diese Spezies kein Signal mehr zu erkennen (Abbildung 36, Nachgärer D).

Wie bereits zuvor für As und Sb waren auch für Hg kaum noch derivatisierbare Quecksilberspezies in den Anlagen A und D detektierbar.

Allgemein zeigten die Hg-Verbindungen eine sehr schlechte Derivatisierbarkeit (im Vergleich der Summe der Hg-Spezies und des ges. Hg; Tabelle 20), was auf einen hohen Anteil an partikelgebundenem, nicht derivatisierbarem Quecksilber hindeuten könnte. Zudem wurde in den Proben ein hoher Gehalt an flüchtigen Schwefelverbindungen detektiert (Chromatogramm nicht aufgeführt). Ein hoher Schwefelgehalt kann die Bildung von Quecksilber-Schwefelverbindungen (hohe Affinität des Quecksilbers zu Schwefel) begünstigen und die Derivatisierbarkeit herabsetzen. Gleichzeitig kann es gerade unter anaeroben Bedingungen zur Bildung von Dimethylquecksilber kommen (Craig *et al.*, 1999):



Es ist also durchaus anzunehmen, dass ein Großteil des Quecksilbers in Form von Schwefelverbindungen (z.B. als HgS) vorliegt. Dies würde die große Diskrepanz zwischen dem Wert für ges. Hg und der Summe der Spezies erklären. Unter diesen Umständen sollten dann sowohl in den Biogasproben als auch in den Kondenswasserproben größere Mengen des Dimethylquecksilbers nachweisbar sein.

Tabelle 20: Quantifizierte Hg-Spezies im Nachgärer der Biogasanlagen A bis D

Hg µg/kg	Anlage A	Anlage B	Anlage C	Anlage D
Hg ^o	<0,01	<0,01	0,03	<0,01
MeHg	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Me ₂ Hg	<0,01	<0,01	0,01	<0,01
?Hg ^{**)}	0,05 ^{*)}	0,21 ^{*)}	0,34 ^{*)}	<0,01 ^{*)}
Summe Spezies	0,05	0,22	0,38	<0,01
Ges. Hg ^{***)}	3,6	1,3	1,8	1,5

^{*)} semiquantitative Konzentrationsbestimmung

^{**)} unbekannte Hg-Spezies

^{***)} aus Kapitel 1.4.2

1.4.3.3 Kondensat - Speziesbestimmung (As, Sb, Hg / Hydridgenerierung)

Arsen (As) - Speziesbestimmung (Kondensat)

In den Kondensaten A bis C der Biogasanlagen wurden zum Teil große Mengen (bis zu 94 µg/kg) an Trimethylarsen nachgewiesen. Lediglich in Anlage D fehlte diese Spezies vollständig. Anorganisches Arsen, wie es in den Anmischbecken und Nachgärern nachweisbar war, ist in den Gaskondensaten erwartungsgemäß nicht bzw. kaum vorhanden (Abbildung 37).

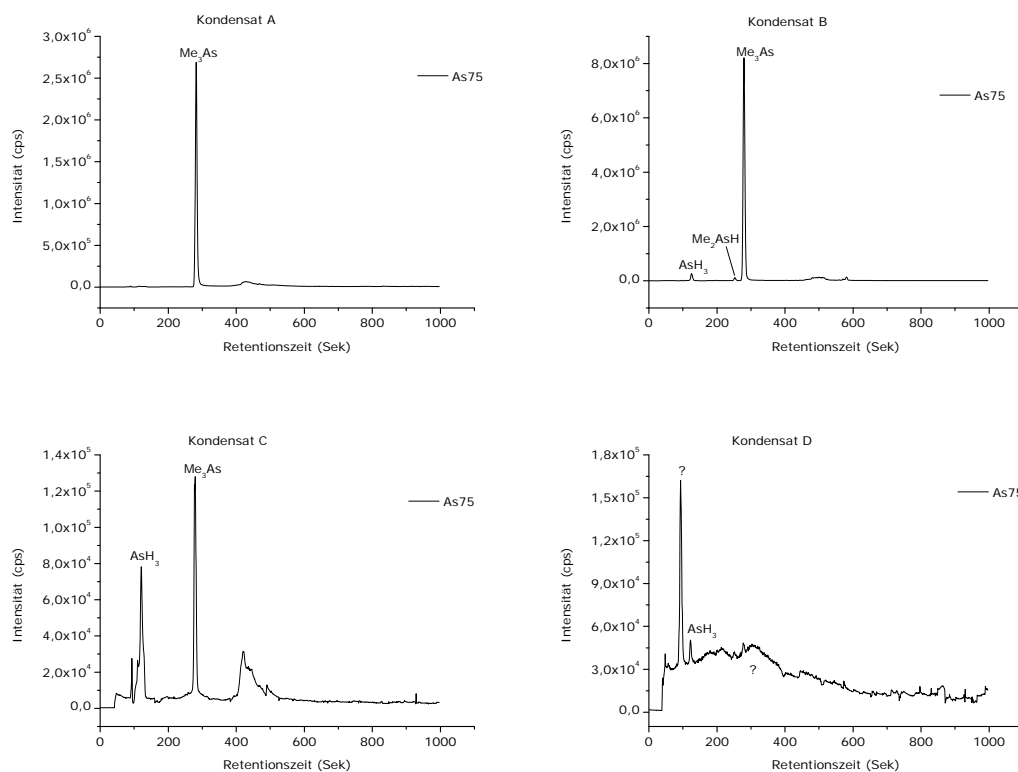
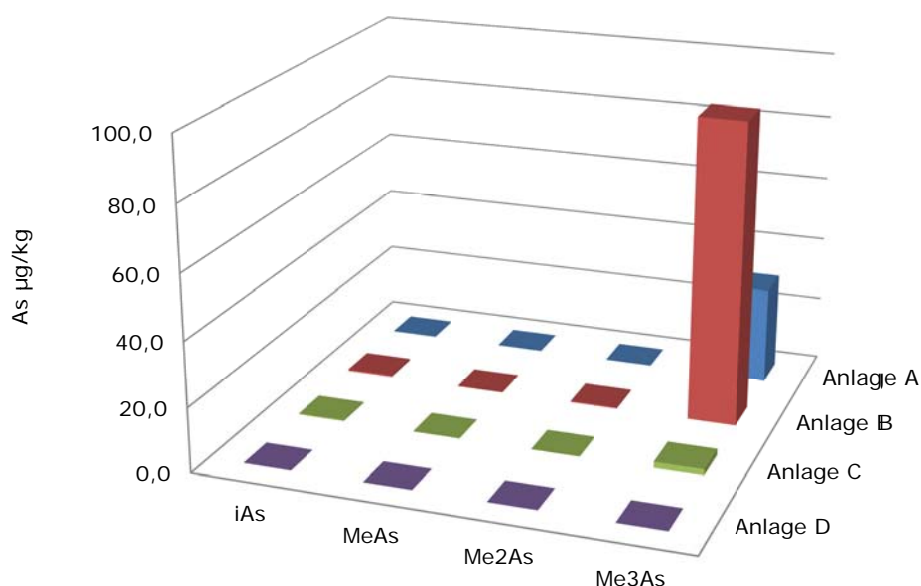


Abbildung 37: Arsen - Speziesanalyse in Kondensaten A – D nach Derivatisierung

Im Kondensat der Anlage C lag die Konzentration an Me_3As weit unter der der Anlagen A und B (Tabelle 21).

Tabelle 21: Quantifizierte As-Spezies in den Kondensaten der Biogasanlagen A bis D



As µg/kg	Anlage A	Anlage B	Anlage C	Anlage D
iAs	n.n.	0,5	0,3	0,1
MeAs	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Me ₂ As	n.n.	0,4	n.n.	n.n.
Me ₃ As	30,0	93,9	1,9	n.n.

Antimon (Sb) – Speziesbestimmung (Kondensat)

Im Gegensatz zu den Proben aus den Anmaischbecken und Nachgärern, in denen das anorganische Antimon die vorherrschende Spezies war, finden sich gerade in den Kondensaten der Anlagen A und B vorwiegend methylierte Spezies bis hin zum Trimethylantimon (Abbildung 38). Im Gegensatz zum Arsen, bei dem lediglich die trimethylierte Spezies eine Rolle spielte, finden sich in Anlage A und B auch erhebliche Mengen Mono- und Dimethylantimon. In den Kondensaten der Anlagen C und D konnten hingegen nur unbekannte (Anlage C) bzw. gar keine Antimonspezies (Anlage D) nachgewiesen werden.

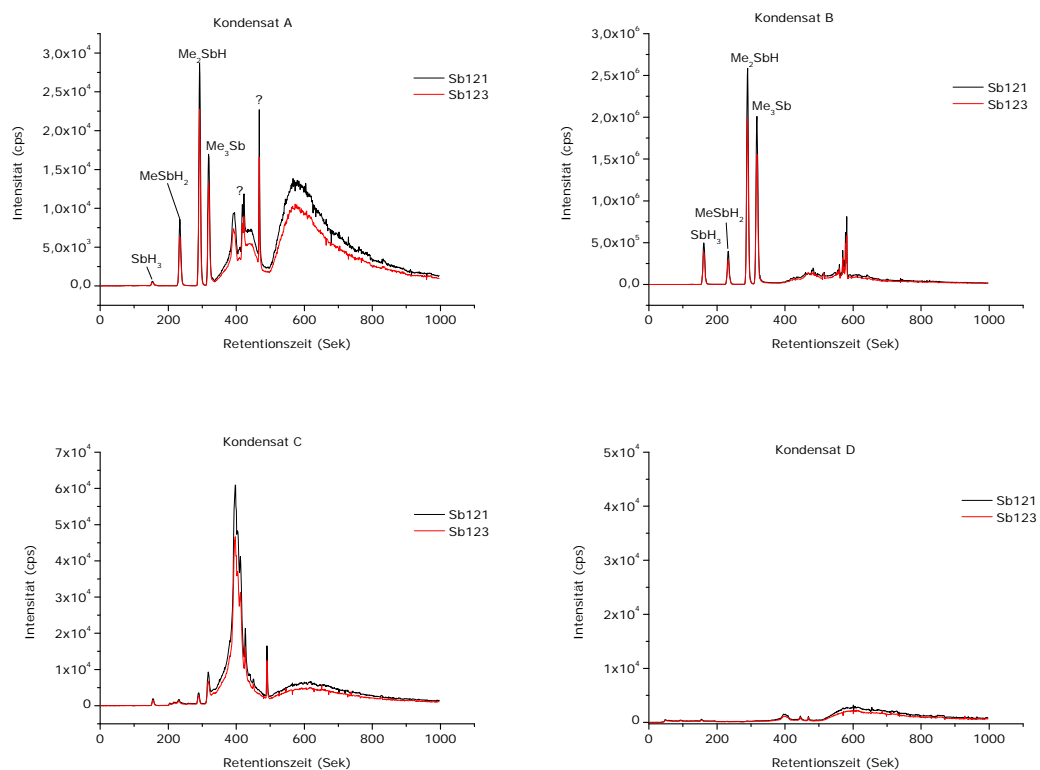


Abbildung 38: Antimon - Speziesanalyse in Kondensaten A – D nach Derivatisierung

Quecksilber (Hg) – Speziesbestimmung (Kondensat)

Wie bereits beim Arsen und Antimon konnte auch beim Quecksilber eine deutliche Konzentration an permethyliertem Quecksilber (Dimethylquecksilber, Me_2Hg) in den Kondensaten nachgewiesen werden (Abbildung 39).

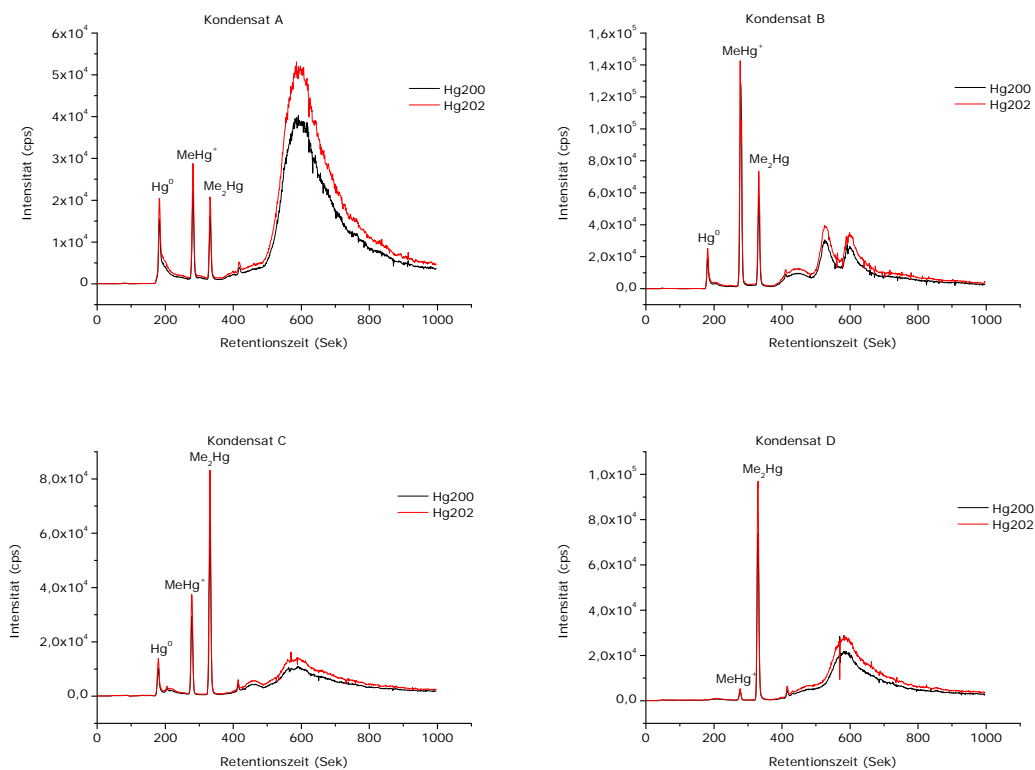


Abbildung 39: Quecksilber - Speziesanalyse in Kondensaten A – D nach Derivatisierung

Wie im Anmaischbecken treten auch hier in den Chromatogrammen der Kondensate unbekannte, unspezifische Quecksilbersignale mit einer Retentionszeit von mehr als 400 Sekunden auf, welche nicht identifiziert werden konnten.

Begründet durch die wesentlich einfachere Probenmatrix der Kondensate im Vergleich zu den Anmaischbecken und Nachgärern stimmen aber die ges. Quecksilbergehalte und die Summe der Hg-Spezies hier im Wesentlichen überein (Tabelle 22).

Tabelle 22: Quantifizierte Hg-Spezies im Kondensat der Biogasanlagen A bis D

Hg µg/kg	Anlage A	Anlage B	Anlage C	Anlage D
Hg°	0,10	0,08	0,03	n.n.
MeHg	0,81	3,22	0,65	0,07
Me ₂ Hg	0,04	0,13	0,11	0,11
?Hg ^{**})	2,21 ^{*)}	0,40 ^{*)}	0,40 ^{*)}	0,62 ^{*)}
Summe	3,17	3,83	1,19	0,80
Ges. Hg ^{**})	2,5	2,5	3,9	1,9

^{*)} semiquantitative Konzentrationsbestimmung

^{**}) unbekannte Hg-Spezies

^{***}) aus Kapitel 1.4.2

Besonders in den Kondensaten der Anlagen B bis D fallen die relativ hohen Dimethylquecksilberwerte (Me₂Hg) auf. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um ein Artefakt der Hydridgenerierung handelt, wurde eine kleine Teilprobe des Kondensates aus Anlage D direkt ohne Derivatisierung analysiert und das Me₂Hg durch ein Inertgas aus dem Kondenswasser ausgetrieben. Auch hier wurde die dimethylierte Spezies in vergleichbarer Konzentration zur Derivatisierung nachgewiesen.

Die Erklärung für die recht hohen Dimethylquecksilberwerte liefert die bereits auf Seite 103 (Quecksilber (Hg) - Speziesbestimmung (Nachgärer)) diskutierte Methylierungsreaktion.

1.4.4 Arsen-Speziesbestimmung in Anmaischbecken, Nachgärern und Kondensaten der Biogasanlagen mittels HPLC – ICP-MS

Gerade Arsenspezies können nur bedingt mittels Hydridgenerierung nachgewiesen werden. Eine Unterscheidung zwischen drei- und fünfwertigen (methylierten) Arsenspezies ist so nur eingeschränkt möglich. Auch eine Aussage darüber, an welcher Phase (gebunden an den Feststoffen oder in der wässrigen Phase) die Arsenspezies in den Proben aus den Anmaischbecken bzw. Nachgärern vorliegen, ist mit der Hydridtechnik nicht möglich. Daher wurde für die Arsenspeziesierung zusätzlich zur Hydridgenerierung der homogenisierten Probe eine HPLC Analyse der wässrigen Phase (Filtration der Probe $< 0,20 \mu\text{m}$) durchgeführt. Die Retentionszeitbestimmung erfolgte mittels des in Abbildung 40 dargestellten Chromatogramms der Arsenspezies As(III), MMA(III), DMA(V), MMA(V) sowie As(V). DMA(III) ist nur als Reinsubstanz stabil und wird in wässriger Lösung schnell zu DMA(V) oxidiert. Diese Spezies findet sich daher nicht in allen Chromatogrammen wieder (siehe auch spezieller Teil, Abbildung 73, Seite 190).

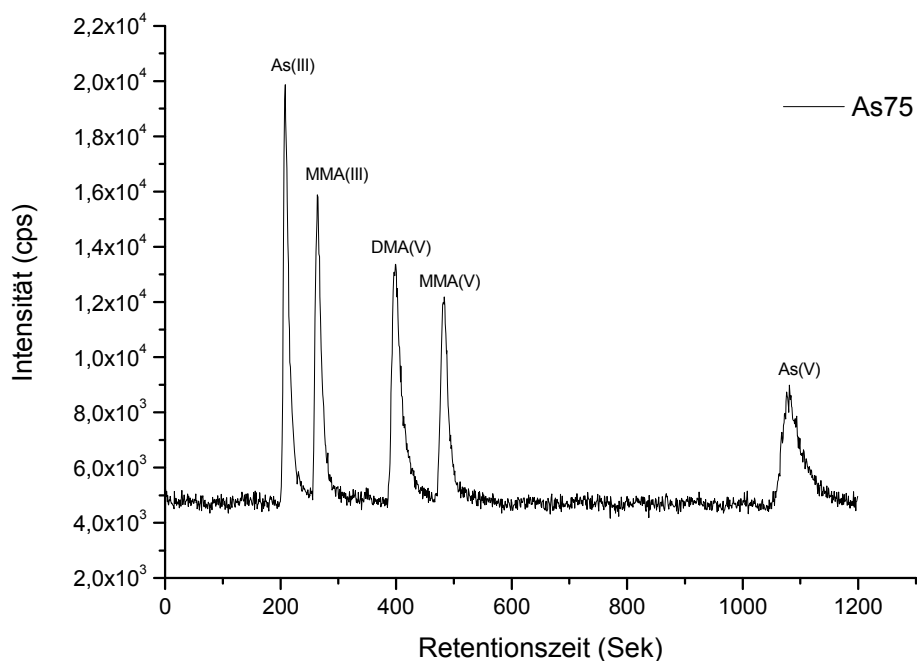


Abbildung 40: Chromatogramm verschiedener Arsen-Spezies (As(III), MMA(III), DMA(V), MMA(V), As(V)) nach HPLC-Trennung (Standard)

1.4.4.1 Anmaischbecken

Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung der Proben aus den Anmaischbecken wurden diese zur Arsenspeziesbestimmung zunächst homogenisiert und die Analysen ausschließlich im Filtrat (0,2 µm) durchgeführt. Neben den bekannten Arsenspezies As(III) und DMA(V), welche auch als Hauptspezies in den Analysen mittels Derivatisierung (Kapitel 1.4.3.1, Seite 92) nachgewiesen werden konnten, konnten im Filtrat des Anmaischbeckens A zwei weitere, bisher nicht identifizierte Arsenspezies mit einer Retentionszeit von 435 bzw. 867 Sekunden nachgewiesen werden (Abbildung 41). Bei dem Signal mit einer Retentionszeit von 761 Sekunden handelt es sich um eine Interferenz durch Argonchlorid und nicht um eine Arsenspezies.

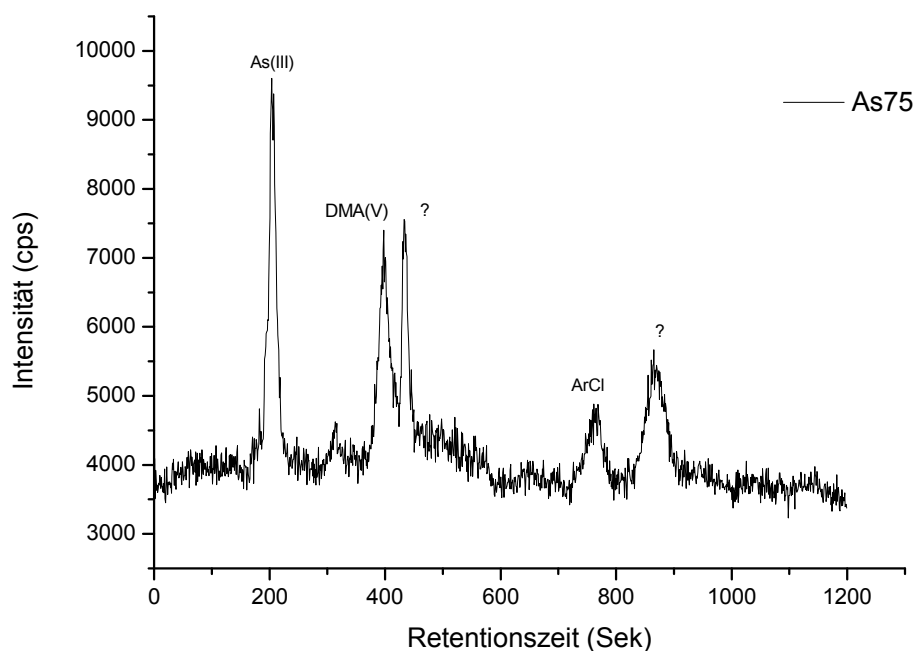


Abbildung 41: Chromatogramm der Arsen-Speziesbestimmung (HPLC-ICP-MS) im Filtrat des Anmaischbeckens der Biogasanlage A. Neben den Spezies As(III) und DMA(V) konnten zwei weitere, unbekannte Arsenspezies (?) mit einer Retentionszeit von 435 und 867 Sek. nachgewiesen werden.

In den Anmaischbecken B und C waren die Arsenkonzentrationen für eine Spezierung in den Filtraten zu gering. Arsenspezies konnten hier auch bei einem großen Injektionsvolumen (10 µl) nicht detektiert werden.

Im Filtrat des Anmaischbeckens D konnte allerdings eine unbekannte Arsenspezies mit einer Retentionszeit von 389 Sekunden (? 389s) nachgewiesen werden.

In den folgenden Tabellen sind die Analysen der Filtrate der Kondenswasserproben auf Arsenspezies zusammenfassend dargestellt. Die Konzentrationen der unbekannten Arsenspezies (? 436s; ? 867s) wurde aufgrund der Kalibrationen der Arsenspezies mit ähnlichen Retentionszeiten abgeschätzt.

Tabelle 23: As-Spezies im Filtrat der Anmaischbecken der Anlagen A bis D

Arsen-Spezies				
(µg As / L)	Anlage A	Anlage B	Anlage C	Anlage D
As (III)	5	n.n.	4	n.n.
MMA (III)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
? 389 s	n.n.	n.n.	n.n.	ca 4
DMA (V)	4	n.n.	n.n.	n.n.
? 436s	ca 4	n.n.	n.n.	n.n.
MMA (V)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
? 867s	ca 4	n.n.	n.n.	n.n.

1.4.4.2 Nachgärer

Die Proben aus den Nachgärern mussten, wie die Proben aus den Anmaischbecken, aufgrund der heterogenen Zusammensetzung vor der Analyse filtriert werden. Auch hier fanden sich verschiedene, teilweise unbekannte Arsenspezies. Die Konzentrationen waren hier gering und lagen unter denen in den Anmaischbecken. Für Anlage A konnte auch im Nachgärer, wie zuvor im Anmaischbecken

As(III) als Hauptspezies für anorganisches Arsen ausgemacht werden. DMA(V) war hier, wie zuvor im Anmischbecken, ebenfalls detektierbar (Abbildung 42).

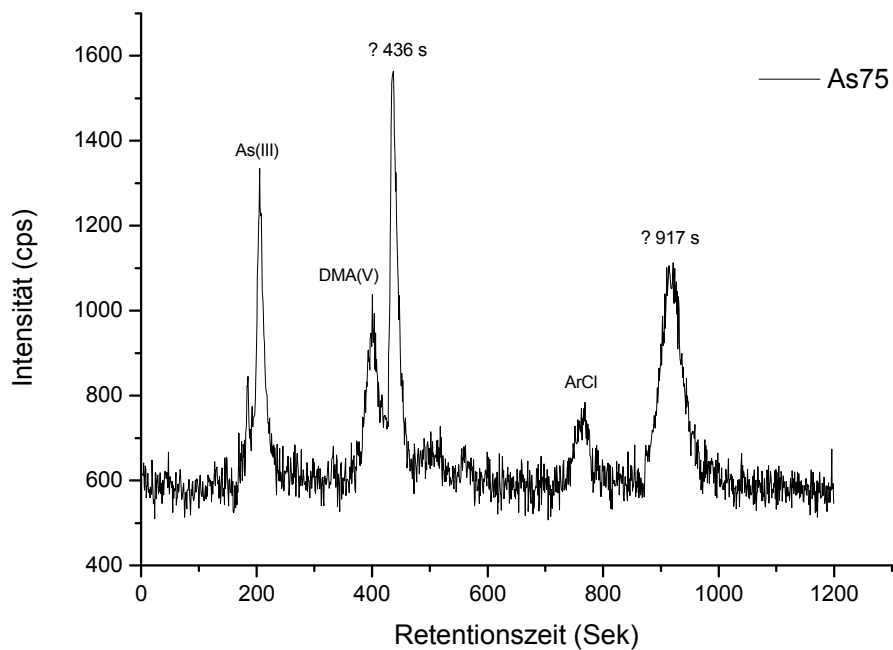


Abbildung 42: Chromatogramm der Arsen-Speziesbestimmung (HPLC-ICP-MS) im Filtrat des Nachgärers der Biogasanlage A.

In den Nachgärern der Biogasanlagen C und D konnten keine Arsenspezies in den entsprechenden Proben nachgewiesen werden.

Die Konzentrationen der unbekannten Arsenspezies (?) wurden aufgrund der Kalibrationen der Arsenspezies mit ähnlichen Retentionszeiten unter Annahme gleicher Ionisierbarkeit abgeschätzt.

Tabelle 24: As-Spezies im Filtrat der Nachgärer der Anlagen A bis D

Arsen-Spezies				
(µg As / L)	Anlage A	Anlage B	Anlage C	Anlage D
As (III)	1	Spuren	Keine Arsenspezies	
MMA (III)	n.n.	n.n.	nachweisbar	
? 389 s	ca. 7	n.n.		
DMA (V)	1	n.n.		
? 436s	1	1		
MMA (V)	n.n.	n.n.		
? 917s	ca. 2	n.n.		

1.4.4.3 Kondenswasserproben

Die Kondensatproben (Kondenswasserproben) stellten eine wesentlich einfachere Matrix dar als die Proben aus den Anmischbecken oder Nachgärern. Zur HPLC-Speziesanalyse wurden aber auch diese Proben zum Schutz der Säule vor der Analyse über einen 0,20 µm Filter filtriert.

Nur in den Kondensaten der Anlagen A und B konnten Arsenspezies nachgewiesen werden. Sowohl in Anlage A als auch in Anlage B wurde anorganisches Arsen in Form von As(III) detektiert (6 bzw. 3 µg/L). Weit größere Arsenkonzentrationen konnten in beiden Anlagen in Form einer unbekannten Spezies mit einer Retentionszeit von 435 Sekunden nachgewiesen werden (Abbildung 43).

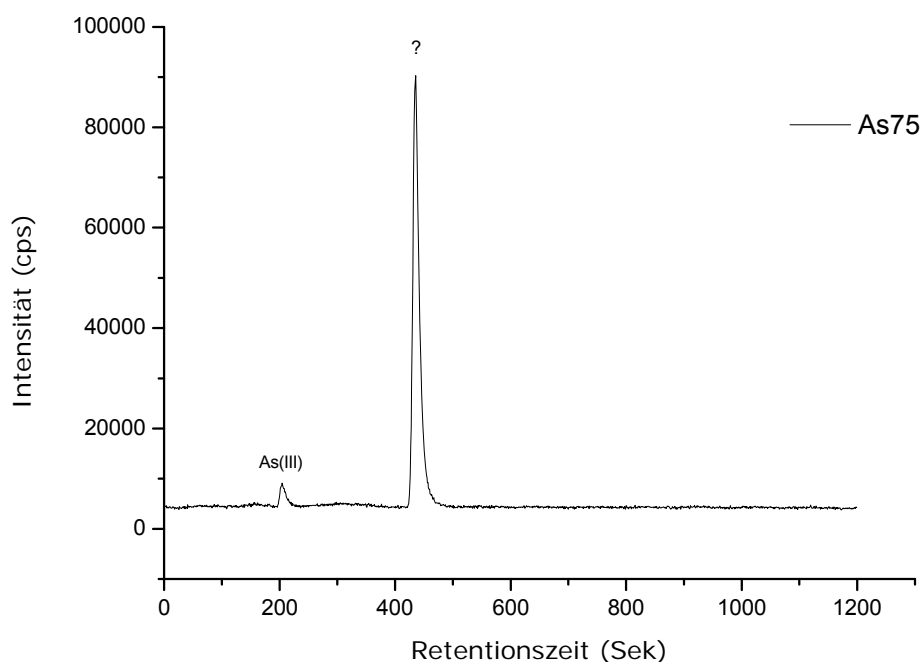


Abbildung 43: Chromatogramm der Arsen-Speziesbestimmung (HPLC-ICP-MS) im Filtrat des Kondenswassers der Biogasanlage B (? = unbekannte Arsenspezies)

Die Quantifizierung dieser unbekannten Spezies ergab Konzentrationen von ca. 40 µg/L im Kondensat der Anlage A bzw. ca. 100 µg/L in Anlage B. In den Anlagen C und D konnten keine Arsenspezies in den Kondenswässern nachgewiesen werden (Tabelle 25).

Tabelle 25: As-Spezies im Filtrat der Kondenswässer der Anlagen A bis D

Arsen-Spezies				
(µg As / L)	Anlage A	Anlage B	Anlage C	Anlage D
As (III)	6	3	Keine Arsenspezies nachweisbar	
MMA (III)	n.n.	n.n.		
DMA (V)	n.n.	n.n.		
? 436s	ca. 40	ca. 100		
MMA (V)	n.n.	n.n.		

Vergleicht man die hier mittels HPLC ermittelten Konzentrationen der Arsenspezies in den Kondenswässern der Anlagen A und B mit den Konzentrationen der gleichen Anlage, die zuvor mittels Hydridgenerierung ermittelt wurden (Kapitel 1.4.3.3, Seite 104), so stellt man eine gute Übereinstimmung der Konzentrationen der unbekannten Spezies mit der nach Derivatisierung ermittelten Me₃As Konzentration fest (Tabelle 26).

Tabelle 26: Vergleich der mittels HPLC ermittelten Konzentrationen der Arsenspezies in den Kondenswässern der Anlagen A und B mit den Konzentrationen der gleichen Anlage, die mittels Hydridgenerierung ermittelt wurden.

Kondenswasser	As (µg/L) *)	As (µg/L)
	Me₃As/ Derivatisierung	Unbek. Spezies / HPLC
Anlage A	30	40
Anlage B	94	100

*) aus: spezieller Teil, Kapitel 1.4.3.3, Seite 104

Dies lässt vermuten, dass es sich bei der mittels HPLC detektierten, unbekannten Arsenspezies um eine dreifach methylierte Arsenspezies handelt.

1.5 Zusammenfassung und Diskussion zu den Biogasanlagen

Vier Biogasanlagen wurden auf leichtflüchtige, methylierte metall(oid)-organische Verbindungen im Biogas, Anmaischbecken, Nachgärer und Gaskondensat untersucht. In allen Anlagen konnten im Biogas permethylierte, metall(oid)organische Verbindungen nachgewiesen werden. Teilweise zeigten sich aber große Unterschiede in den Proben innerhalb einer Anlage (vgl. Kapitel 1.4.1.2, Seite 80). Hier konnten in Probe 1 der Anlage B extrem hohe Me_3Sb Kon-



Abbildung 44: Probennahmestelle für Biogas an Biogasanlage A (beste Probennahmebedingungen aller Anlagen)

zentrationen (7000 ng/m^3) detektiert werden. Im Gegensatz dazu lag der Messwert in Probe 2 der gleichen Anlage nur knapp über der Nachweisgrenze. Eine Erklärung dieser, teilweise auch innerhalb anderer Proben auftretenden Diskrepanz, findet sich leicht bei genauerer Betrachtung der Probennahmestellen. Da ein direkter, passender Anschluss zur Probenahme nur an den Anlagen A und D vorhanden war, war bei den Anlagen B und C die Installation einer behelfsmäßigen Probenahmestelle notwendig. Bereits bei den vorhandenen Probennahmestellen

waren die Bedingungen bei weitem nicht ideal. Abbildung 44 zeigt die Anschlussstelle innerhalb der Biogasleitung vom Gasspeicher zum Generator der Biogasanlage A. Deutlich ist hier das Endstück mit Entnahmehahn zu sehen, in dem es zur Kondensation (Ansammlung) der metall(oid)organischen Verbindungen kommen kann. Aufgrund der gegebenen Bedingungen war es in der Regel nicht möglich, die Probennahmeapparatur bzw. Probennahmeleitung mit größeren Volumina des Biogases zu spülen (Explosionsgefahr!). Dies zeigt, dass für weitere Untersuchungen an solchen Anlagen zunächst die Voraussetzungen zur Probennahme wesentlich verbessert werden müssen, was am besten bereits beim Bau dieser Anlagen zu berücksichtigen ist.

Der Konzentrationsbereich der permethylierten Spezies lag, zusammenfassend für alle untersuchten Anlagen, zwischen 31-694 ng/m³ Me₃As, 0-2 ng/m³ Me₂Hg, 0-7000 ng/m³ Me₃Sb und 0-79 ng/m³ Me₄Sn (in den vorherigen Kapiteln nicht einzeln aufgeführt). Eine Beurteilung dieser Werte ist aber nur im Vergleich mit anderen Hotspots möglich.

Daher wurden in Abbildung 45 die Emissionen verschiedener Quellen permethylierter, metall(oid)organischer Verbindungen wie natürliche Gase (Natural Gas), Deponiegas (Landfill Gas), Klärgas (Sewage Gas) und Gaskondensate (Gas Condensate) den Biogasanlagen gegenüber gestellt. Das Balkendiagramm gibt die Konzentrationsbereiche der nachgewiesenen Verbindungen aus verschiedenen Literaturquellen (Review Artikel) an (Rettenmeier *et al.*, in Vorbereitung). Dieses Diagramm wurde durch die hier erhaltenen Werte aus den Biogasanlagen (rote Balken) erweitert. Die im Biogas ermittelten Werte für Trimethylarsen sind mit denen im Klär- und Deponiegas vorhandenen Konzentrationen durchaus vergleichbar. Auch die Konzentrationen von Me₃Sb und Me₄Sn sind denen im Klär- und Deponiegas ähnlich, wobei für Me₃Sb auch Konzentrationen ermittelt wurden, die über die Effekt-Konzentration von 10³ ng/m³ hinausgehen.

Auffallend sind die doch eher geringen Konzentrationen von Me₂Hg. Diese liegen im Klär- und Deponiegas oft deutlich höher. Allerdings wurden im Biogas deutlich höhere Werte an Hg⁰ nachgewiesen (bis zu 519 ng/m³ in Anlage B). Im Vergleich dazu kann Quecksilber im Erdgas in Konzentrationen von bis zu einigen mg/m³, auch hier hauptsächlich in elementarer Form, enthalten sein (Hammer *et al.*, 2011). Organische Quecksilberspezies, insbesondere Dimethylquecksilber (Me₂Hg) sind auch hier nur in geringeren Konzentrationen vorhanden (Snell *et al.*, 1996). Hg⁰ ist oftmals die dominierende, flüchtige Spezies. Dies konnte auch bei der Analyse von Bodenausgasungen beobachtet werden. Auch hier wurde nicht nur Me₂Hg nachgewiesen, sondern ebenfalls Hg⁰ als Hauptspezies ausgemacht (Hindersmann *et al.*, in Vorbereitung).

Auch in Biogasanlagen scheint es nur zu einer geringeren Methylierung des Quecksilbers zu kommen. Ein Erklärungsansatz ergibt sich aus Abbildung 9 (all-

gemeiner Teil, Seite 34). So sind in Biogasanlagen meist auch große Mengen an schwefelhaltigen Verbindungen vorhanden und es herrschen reduzierende Bedingungen. Bei hohen Schwefelkonzentrationen werden, wie im allgemeinen Teil, Kapitel 2.5, Seite 31 beschrieben, Charge-Transfer-Komplexe des Hg gebildet, was die Bioverfügbarkeit dieser Verbindungen reduziert und somit auch die Methylierungsraten verringern kann.

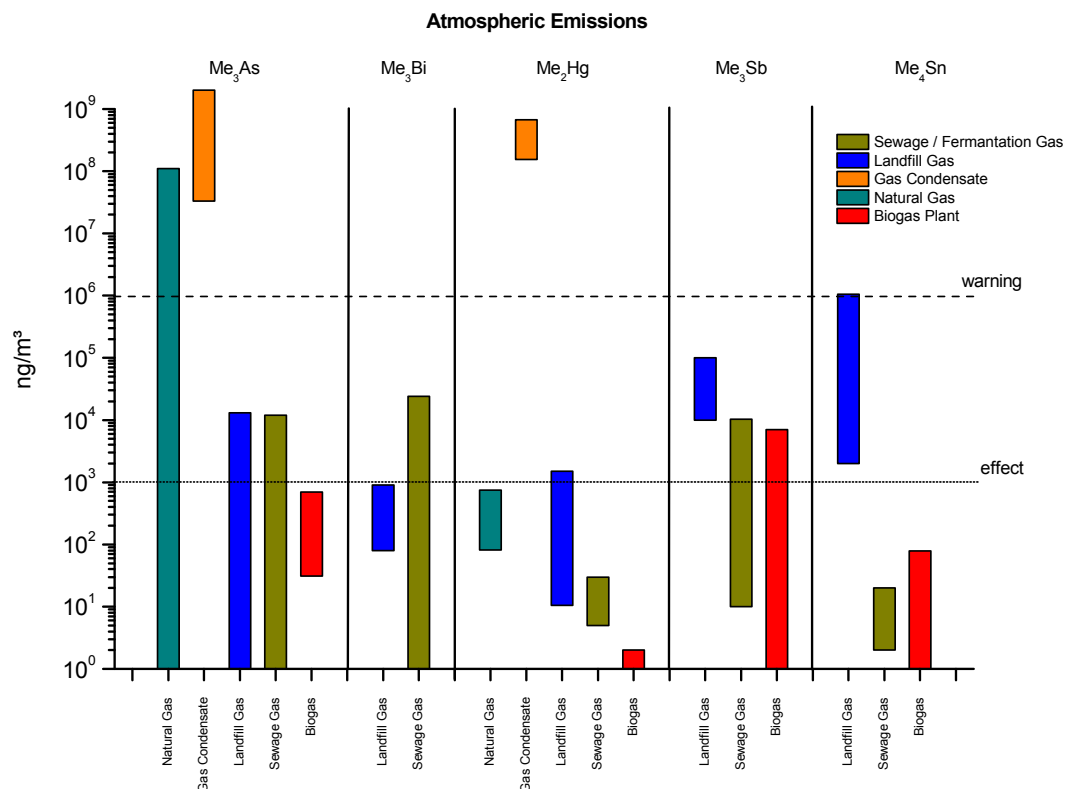


Abbildung 45: Vergleich der Emissionen permethylierter, metall(oid)organischer Verbindungen aus natürlichen Gasen (Natural Gas), Deponiegas (Landfill Gas), Klärgas (Sewage Gas) und Gaskondensaten (Gas Condensate) im Vergleich mit Biogasanlagen. Vergleichswerte und Abbildung entnommen aus: Rettenmeier *et al.* (in Vorbereitung).

Es ist auch anzunehmen, dass ein großer Teil des Quecksilbers an Thiogruppen enthaltenden Verbindungen gebunden ist und nicht als freie Kationen in biologischen Systemen (hier Pflanzenreste, Gülle usw.) existiert.

Wie bereits eingangs beschrieben ist es schwierig diese Komplexe analytisch zu erfassen und zu identifizieren. Weiterhelfen könnte hier die von Krupp *et al.* entwickelte Methode zur Identifizierung von biologischen Quecksilber-Schwefel-Verbindungen (Cystein- und Glutathionkomplexe) in Pflanzen unter Verwendung einer simultanen HPLC - ESI-MS / ICP-MS Kopplung (Krupp *et al.*, 2008).

Biogas enthält, wie gezeigt werden konnte, durchaus relevante Konzentrationen an permethylierten, metall(oid)organischen Verbindungen. Auch wenn zunächst



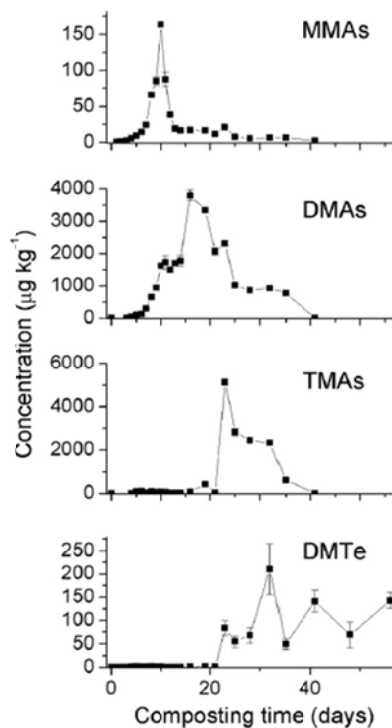
Abbildung 46: Anmaischbecken einer Biogasanlage (Öffnung)

zu vermuten ist, dass die gebildeten Spezies bei der Verbrennung wieder zum Metall bzw. Metalloxid umgewandelt werden, so ist doch zu beachten, dass es sich bei Biogasanlagen eben nicht um geschlossene Systeme handelt.

Gerade in den Anmaischbecken, welche bereits eine hohe biologische Aktivität aufweisen, werden die Inputmaterialien über mehrere Tage gelagert bevor sie in die Gärbehälter überführt werden. Für diese Anmaischbecken ist mit einer vergleichbaren Produktion metall(oid)organischer Verbindungen zu rechnen, wie sie auch in den Gärbecken (Fermentern) festgestellt werden konnte. Im Gegensatz zu den Gärbecken, welche mit einer Plane überspannt sind, sind diese Anmaischbecken in der Regel offen (Abbildung 46). Auch im Nachgärer konnten methylierte Spezies nachgewiesen werden, welche spätestens beim Ausbringen dieser Substanzen und beim Entleeren der Becken in die Umwelt gelangen. Weitere Untersuchungen der Ausgasungen aus den Anmaischbecken und der Gasphasen beim Ausbringen / Entleeren der Nachgärer sind hier, in möglichen Folgeprojekten, unbedingt erforderlich. Die Fermenter selbst sind üblicherweise

mit einer Plane abgedeckt. Wie die Untersuchungen der Handschuhmaterialien im folgenden Kapitel (spezieller Teil, Kapitel 3, Seite 137) zeigen, sind viele Kunststofffolien aber keine Barriere für metall(oid)organische Verbindungen. Es ist anzunehmen, dass auch hier flüchtige, permethylierte Verbindungen durch diese Folien entweichen können. Entsprechende Tests sollten auch hier hinsichtlich des verwendeten Materials durchgeführt werden.

Neben dem Biogas wurden auch die Anmaischbecken, die Nachgärer sowie das Kondenswasser untersucht. Dabei konnten sowohl in den Anmaischbecken als



(Diaz-Bone *et al.*, 2011)

Abbildung 47: Speziesverteilung von Arsen im Kompost über einen Zeitraum von 0 bis 60 Tagen

auch in den Nachgärern sehr unterschiedliche As-Speziesverteilungen ermittelt werden (vgl. Tabelle 17 und Tabelle 19), was auf die unterschiedlich langen Gärzeiten zurückzuführen ist. Dass die Speziesverteilung von der Zeit abhängig ist, konnten Diaz-Bone *et al.* bereits an Kompostierungsversuchen zeigen (Abbildung 47). Hier traten zu Beginn monomethylierte Spezies auf, während im Laufe der Kompostierung vermehrt permethylierte Verbindungen nachgewiesen werden konnten (Diaz-Bone *et al.*, 2011). Leider konnte nicht in Erfahrung gebracht werden, wie lange sich zum Zeitpunkt der Probennahme die Biomasse bereits in den Gärbehältern befand. Auch eine Massenbilanz ist nicht möglich, da weder das Volumen des abgeschiedenen Kondenswassers (möglicherweise auch eine

Rückführung des Kondenswassers in die Anmaischbecken?) noch die Massen/Volumina der Anmaischbecken, Nachgärer sowie das gebildete Biogasvolumen bekannt sind. Um weitere Aussagen über die Bildung metall(oid)organischer Verbindungen treffen zu können, ist eine weitaus genauere Betrachtung der einzelnen Anlagen mit mehrmaligen Probennahmen

unter kontrollierten Bedingungen notwendig. Dazu gehört auch die genaue Analyse der Input-Materialien sowie eine Abschätzung der austretenden Gase außerhalb des Fermenters. Auch eine gleichzeitige mikrobiologische Untersuchung in Verbindung mit Metallorganik-Speziierung wäre wünschenswert und ist bereits in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen angedacht.

Bei der HPLC-Analyse der filtrierten Proben aus den Anmaischbecken, Nachgärern und Kondensaten konnten, neben As(III) und DMA(V) auch weitere, unbekannte Spezies nachgewiesen werden. Eine Identifizierung war, allein über die Retentionszeit und das ICP-MS – Signal nicht möglich. Abhilfe kann hier eine parallele Kopplung von HPLC-ESI/MS mit ICP-MS schaffen, mit der dann neben Element- auch Molekülinformationen erhältlich sind. Eine solche Kopplung wird zurzeit am Institut für Umweltanalytik durch Herrn Hollmann etabliert und kann für Nachfolgeprojekte eingesetzt werden. Allerdings sind dieser Methode aufgrund des verwendeten Laufmittels und dem Anteil an organischem Lösemittel noch enge Grenzen gesetzt.

Es sei noch darauf hingewiesen, dass als Alternative zur Hydrierung auch Versuche zur Derivatisierung mittels Natriumtetraethylborat durchgeführt wurden. Diese ergaben aber keine Umsetzung der Metall(oid)e in flüchtige Spezies und somit erwies sich die Ethylierung hier als ungeeignete Methode.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen an Biogasanlagen wurden bereits auf dem „Fachgespräch Feststoffuntersuchung“ des Ministeriums für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (LANUV, 06. März 2012) vorgestellt und diskutiert.

2. Speziesbestimmung in Deponiewässern

Parallel zur Probennahme an den Biogasanlagen sollte auch eine Speziierung der Quecksilber- und Arsenverbindungen in Deponiewässern erfolgen.

Als Deponiewasser wird im allgemeinen Wasser aus Niederschlägen bezeichnet, welches eine Deponie durchfließt. Bei diesem Prozess werden die im Abfall enthaltenen löslichen Schadstoffe aufgenommen. Die Belastung des Sickerwassers hängt dabei von der Zusammensetzung der Deponie, der Witterung sowie den biochemischen Abbauvorgängen ab. Auch die Belastung des Deponiesickerwassers mit Chloriden (bis zu mehreren g/l) spielt hierbei eine große Rolle.

Gerade auf hochbelasteten Flächen (Altlasten) wie z.B. am Industriepark Höchst, an dem riesige Mengen an Grund- und Sickerwasser abgepumpt werden ($\sim 320 \text{ m}^3/\text{h}$), um eine Kontamination des Mains zu verhindern (Arsenbelastung im Einlauf der Wasserreinigungsanlage: 170 bis $590 \text{ }\mu\text{g/l}$), ist nicht nur eine Gesamtmetall- sondern auch eine Speziesanalytik interessant; wurde hier aber lediglich versuchsweise und auch nur zur Unterscheidung von As(III) und As(V) durchgeführt¹⁴. Ähnliches gilt für viele weitere Deponien.

Im Folgenden wurden daher verschiedene Deponiewasserproben aus den Bezirken „M“ und „L“ auf ihre Gesamtgehalte (Hg, As, Sb) sowie auf ihre Arsen- und Quecksilberspezies hin untersucht. Dabei sollte die Speziierungsmethode für Arsen auf den Einfluss hoher Chloridkonzentrationen überprüft werden.

¹⁴ Persönliche Kommunikation: H. Herzog, Infraserb Höchst, Fachgespräch Feststoffuntersuchung 2012, Essen, 06.03.2012.

2.1 Probennahme

Details zur Probennahme der Deponiewässer sind an den jeweils zuständigen Außenstellen des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW vorhanden, waren aber nicht einsehbar und dürfen nur in anonymisierter Form wiedergegeben werden. Daher wurden auch die Bezeichnungen der Deponien anonymisiert. Die Proben der Deponiewässer (Bereiche „M“ und „L“) wurden nach der Probennahme kühl transportiert und gelagert (4°C). Von der Anlieferung bis zur Analyse wurden die Proben im Institut für Umweltanalytik bei -20°C gelagert. Die Probenvorbereitung und Analysenmethoden sind auch hier in den einzelnen Kapiteln beschrieben.

Deponiewasser-Proben

Von den Deponiewässern aus dem Bereich „L“ wurden insgesamt sechs Proben untersucht. Zwei Wässer der Deponie „O“ mit den Probennummern 2761 und 2762, sowie vier Wässer der Deponie „W“ mit den Probennummern 2763 bis 2766. Von jeder Messstelle wurden jeweils zwei Proben in je 250 und 500 ml PE-Flaschen abgefüllt.

Die Proben aus dem Bereich „M“ stammen von verschiedenen Deponien, an denen unterschiedliche Wässer in bis zu vier Teilproben genommen wurden, was eine Gesamtzahl der Proben (incl. aller Teilproben) von 19 ergab. Tabelle 27 gibt eine Übersicht über die zu untersuchenden Proben sowie die Anzahl der jeweils genommenen Teilproben und Probenbezeichnungen.

Tabelle 27: Einzelprobenübersicht Deponiewässer Bereich „M“

Probe Nr.	Deponie / Bezeichnung	Anzahl Teilproben*)
2666	Ablauf Sickerwasserspeicher	2
2667	Deponie Ki	2
2668	Ablauf Umkehrosmose	1
2671	Ablauf Venturi	3
2698	Deponie-Sickerwasser	1
2699	Deponie Ww 1+2	2
2702	Deponie Kü Speicherbecken	1
2703	Deponie Ww Gesamt-Zulauf	1
2705	Deponie Ww 1 Zulauf	1
2706	Deponie War Sickerwasser	1
2711	Deponie-Sickerwasser	4

*) Unterschiedliche Anzahl an Teilproben in 500 ml bzw. 250 ml PE Flaschen
(250 ml PE Flaschen als Rückstellproben gekennzeichnet)

2.2 Methoden und Geräte

2.2.1 Gesamtmetallgehalte

Die Bestimmung des Gesamtquecksilbers erfolgte, wie zuvor für die flüssigen Proben aus den Biogasanlagen, mittels des in Kapitel 3.1 (allgemeiner Teil, Seite 38) beschriebenen DMA 80 Gesamtquecksilber-Analysators. Die Einwaage betrug etwa 100 bis 200 mg (100 bis 200 µl).

Zusätzlich zu den durch AAS (DMA 80) bestimmten ges. Quecksilbergehalten wurden die Gesamtmetallkonzentrationen der Elemente As, Sb und Hg mittels ICP-MS bestimmt. Im Gegensatz zur ges. Hg Analyse mittels DMA80 war bei der ICP-MS Analyse eine vorherige Filtration der Proben durch einen 0,45µm Filter notwendig um ein Verstopfen des Nebulizers zu verhindern. Die Gesamtmetallgehalte in den Wässern sind in Kapitel 2.3.1 aufgeführt.

2.2.2 Speziierung (Arsen)

Die Speziierung der Arsenverbindungen in den Deponiewässern erfolgte auch hier mittels HPLC/ICP-MS. Vor der Speziesanalyse mussten die Proben mittels eines 0,20 µm Filters von Schwebstoffen gereinigt werden, da ansonsten die Gefahr eines Verstopfens der chromatographischen Säule besteht. Die Filtration bedingt aber auch, dass evtl. an diesen Partikeln gebundene Arsenspezies nicht mehr erfasst werden können. Da die Proben nach der Filtration sehr sauber waren, konnte an Stelle der zuvor verwendeten Säule (Luna, 3 µ C18(2), 150 x 4,6 mm) eine Core-Säule (Kinetex®, 2,6 µ C18, 100 x 4,6 mm, 100 Å, Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet werden. Dies reduzierte die Analysenzeiten von über 1000 auf etwa 350 Sekunden.

Zur Chromatographie wurde auch hier eine „Agilent 1100“ HPLC eingesetzt, welcher zur Detektion des Arsen-Signals (⁷⁵As) an ein ICP-MS (Modell 7500a, Agilent, Waldbronn) gekoppelt wurde. Die Laufmittel-Zusammensetzung zur As-Speziesbestimmung ist bereits in Tabelle 11 (Seite 74) angegeben. Die Elution

der Arsenspezies erfolgte unter isokratischen Bedingungen mit einem Volumenstrom von 1 ml/min. Alle weiteren Angaben, sowie ein typisches As-Spezies-Diagramm (Standard), können dem vorherigen Kapitel entnommen werden¹⁵.

Zur Überprüfung des Einflusses des Chloridgehaltes auf die As-Spezifizierungsmethode wurde der Arsen-Speziesstandard mit hohen Chloridkonzentrationen (0 bis 200 g/l) versetzt und auf die HPLC-Säule aufgegeben.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 Gesamtmetallgehalte

Die Bestimmung der Quecksilbergehalte in den Deponiewässern erfolgte sowohl mittels eines „DMA 80 - Direct Mercury Analyzers“ (US EPA Method 7473, 2007) als auch durch ICP-MS. Die Gesamtquecksilbergehalte in den Deponiewässern sind in den folgenden Tabellen für die jeweiligen Bereiche „M“ bzw. „L“ zusammengefasst. Angegeben ist der Gesamtquecksilbergehalt nach Dreifachbestimmung in µg/L.

Allgemein wurden nur geringe Hg und Sb Konzentrationen in den Deponiewässern nachgewiesen (< 2 bzw. 10 µg/L). Die Arsenbelastung in den Deponiewässern war hingegen sehr unterschiedlich. Während an der Deponie „O“ (Bereich L) nur geringe As-Konzentrationen gemessen wurden, zeigten sich an der Deponie „W“ deutlich höhere Werte mit bis zu 196 µg As/L (Tabelle 28). Ähnlich hohe Werte (183 µg As/L) wurden an Messstelle 2711/ Teilprobe 2 im Bereich „M“ gemessen (Tabelle 29).

¹⁵ Generell eignet sich diese Analysemethode auch für viele weitere As-Speziesbestimmungen (z.B. Arsenspezies in Reiswein oder Bier). Für interessierte Leser findet sich eine solche Analyse verschiedener Biersorten im Anhang **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** dieser Arbeit.

Tabelle 28: Gesamtmetallgehalte (µg/kg) in Deponiewässern aus dem Bereich „L“ (ICP-MS Methode)

Probe Nr.	Name	ICP-MS			DMA 80
		As µg/L	Sb µg/L	Hg µg/L	Hg µg/L ^{*)}
2761	Deponie O	1,4	0,8	0,8	<NWG
2762	Deponie O	1,4	0,8	0,8	0,3
2763	Deponie W	195,8	2,6	0,7	<NWG
2764	Deponie W	119,6	5,0	0,8	<NWG
2765	Deponie W	42,6	2,8	0,9	<NWG
2766	Deponie W	64,8	4,0	0,8	<NWG

*) Nachweisgrenze: 0,2 µg/l (siehe spezieller Teil, Kapitel 1.3.1, Seite 71)

Tabelle 29: Gesamtmetallgehalte (µg/l) in Deponiewässern aus dem Bereich „M“ (ICP-MS-Methode sowie DMA 80 - Methode)

Probe Nr.	Bezeichnung Deponie	Teil- probe	ICP-MS			DMA 80
			As µg/L	Sb µg/L	Hg µg/L	Hg µg/L ^{*)}
2666	Ablauf Sickerwasserspeicher	1	2,5	1,3	0,9	<NWG
		2	1,4	1,5	0,8	<NWG
2667	Deponie Ki	1	9,9	1,8	1,0	<NWG
		2	12,0	1,8	1,2	0,3
2668	Ablauf Umkehrosmose	2	125,8	1,1	1,2	<NWG
2671	Ablauf Venturi	1	7,0	1,1	1,1	<NWG
		2	6,5	1,2	0,9	<NWG
		3	69,4	4,0	0,8	<NWG
2698	Deponie Sickerwasser	1	5,6	8,6	2,6	0,3
2699	Deponie Ww 1+2	1	8,2	1,4	1,4	<NWG
		1	1,3	2,8	1,3	<NWG
2702	Deponie Kü Speicherbecken	1	11,5	1,9	1,2	<NWG
2703	Deponie Ww Gesamt-Zulauf	1	7,6	1,1	1,0	0,3
2705	Deponie Ww 1 Zulauf	1	4,7	3,7	0,9	<NWG
2706	Deponie Wa Sickerwasser	1	9,3	9,1	0,9	<NWG
2711	Deponie-Sickerwasser	2	182,8	6,1	1,1	<NWG
		3	66,4	5,3	2,0	<NWG
		4	26,6	4,0	1,1	<NWG
KB-ZD	Deponie K Zulauf Deponie 2	2	32,3	0,0	1,1	<NWG

*) Nachweisgrenze: 0,2 µg/l (siehe spezieller Teil, Kapitel 1.3.1, Seite 71)

Die mittels des DMA 80 ermittelten Gesamtquecksilberkonzentrationen lagen nahezu vollständig unterhalb der Nachweisgrenze dieses Gerätes. Nur bei vier Proben konnte mit dieser Methode überhaupt Quecksilber, knapp oberhalb der Nachweisgrenze von 0,2 µg/l, in den Deponiewässern nachgewiesen werden.

2.3.2 Speziesbestimmung im Deponiewasser

Die Gesamtmetallgehalte waren sowohl für Antimon als auch für Quecksilber sehr gering. Dennoch wurde für das Element Quecksilber eine Speziesanalyse mittels Hydridgenerierung durchgeführt. Diese Analyse ergab als Spezies lediglich anorganisches Quecksilber. Elementares oder teilmethyliertes Quecksilber (MeHg) konnte nicht nachgewiesen werden.

Aufgrund der allgemein sehr geringen Antimonkonzentrationen in den Deponiewässern wurde auf eine weitere Speziierung verzichtet und die Speziesanalyse nur für Arsen weitergeführt.

2.3.2.1 Retentionszeitabhängigkeit der Arsenspezies vom Chloridgehalt

Während der ersten Messungen zur As-Speziierung wurden, hauptsächlich für As(V), erhebliche Retentionszeitschwankungen (bis zu 10 Sekunden) festgestellt, sodass eine eindeutige Zuordnung der Signale nicht mehr möglich war. Dass es sich bei dem später eluierenden Signal dennoch um diese Spezies handelt, konnte durch Aufstocken der Proben mit einem As(V) Standard festgestellt werden. Dennoch stellte sich die Frage, wie es zu diesen Signalverschiebungen kommen konnte.

Wie bei der Detektion von Arsen mittels ICP-MS üblich wurde auch hier, zur Bestimmung auftretender Argonchloridinterferenzen (vgl. allgemeiner Teil, Kapitel 3.3, Seite 44) neben der Arsenspur ($m/z=75$) auch die Massenspur des Chlorids

($m/z=35$) aufgenommen. Einige Proben zeigten hier erhebliche Signale auf der Masse des Chlorids (Abbildung 48).

Auffallend war, dass gerade stark Retentionszeit verschobene Chromatogramme eine hohe Chloridinterferenz aufwiesen.

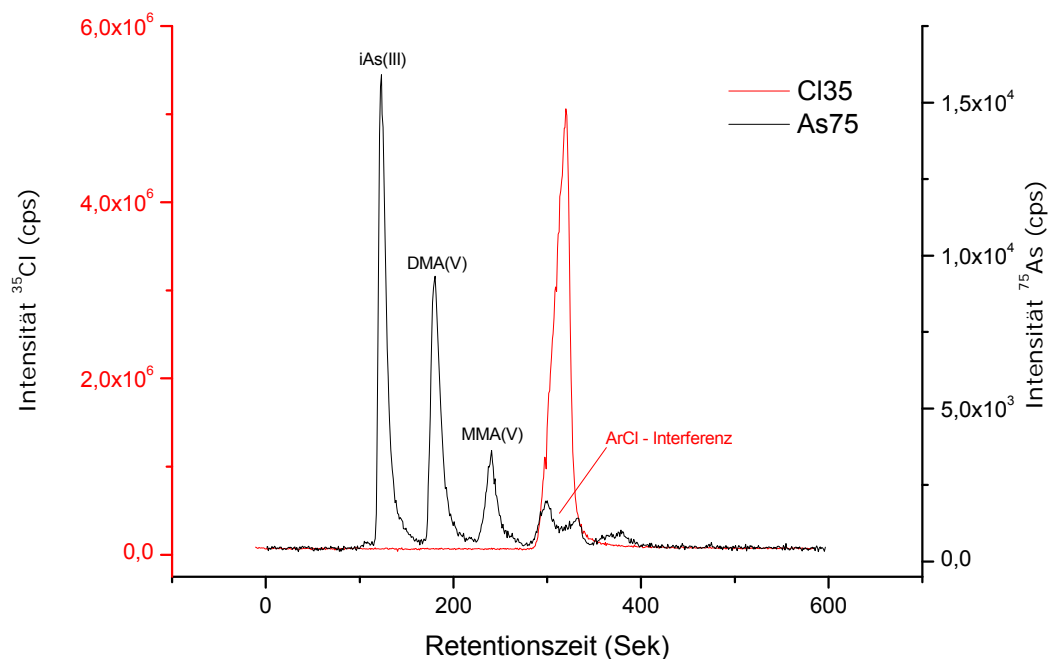


Abbildung 48: As-Spezies im Deponiewasser aus dem Bereich „M“ (Probe 2671, Teilprobe 3) bei vorhandener Argon-Chlorid Interferenz.

Zur Klärung dieser Frage wurden dem zur Kalibration benutzen Multi-Arsenstandard (Kapitel 1.4.4) verschiedene Chlorid-Konzentrationen (in Form von NaCl) zugesetzt und zunächst die Fläche des Chlorid-Signals bestimmt. Diese zeigt einen linearen Anstieg des Flächenintegrals des Chlorid-Signals bei ansteigender NaCl-Konzentration. Betrachtet man die ^{75}As -Signale dieser Multi-Arsen-Standards bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen, so findet auch hier eine Retentionszeitverschiebung des As(V)-Signals statt. Abbildung 49 zeigt die Massenspektren des Arsens (^{75}As) im reinen Standard sowie bei Zusatz von NaCl

(5 g/l). Deutlich ist eine Verschiebung des As(V) Peaks von 342,2 auf 346,6 Sekunden zu erkennen. Bei allen anderen Spezies bleiben die Retentionszeiten und Peakflächen konstant. Allerdings ändert sich beim MMA(V) die Peakhöhe. Mit zunehmender NaCl-Konzentration wird der Peak schmaler und höher.

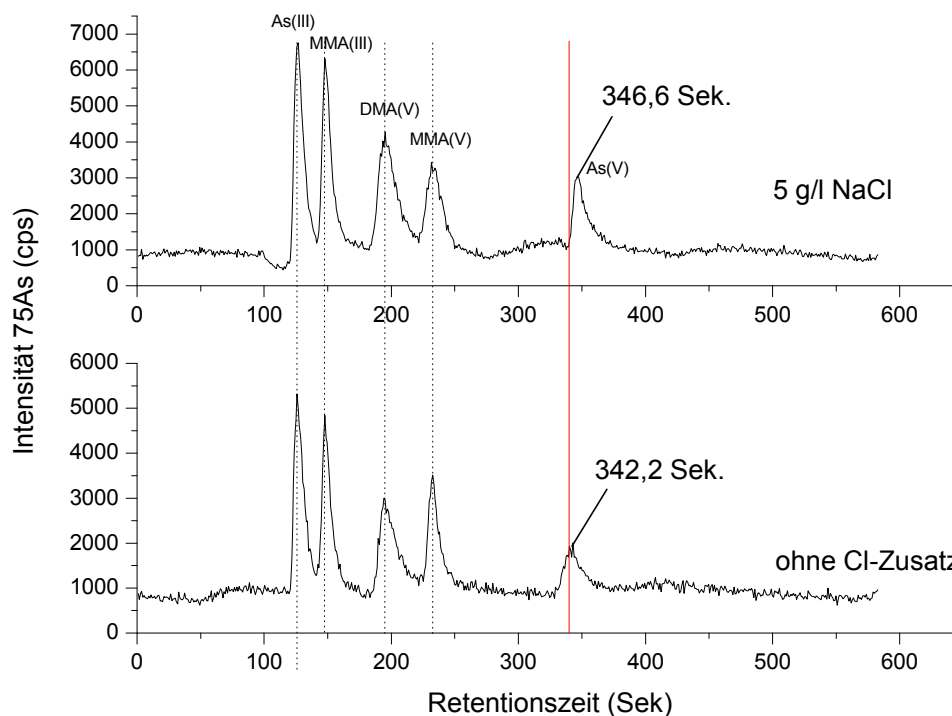


Abbildung 49: Retentionszeitverschiebung von As(V) bei hohen NaCl-Konzentrationen. Oben: Chromatogramm eines As-Multi-Standards (20 pg As je Spezies) mit einer NaCl-Konzentration von 5 g/l. Unten: Chromatogramm ohne NaCl-Zusatz.

Durch weitere Erhöhung der NaCl-Konzentration lässt sich die Retentionszeit des As(V) noch wesentlich weiter verschieben. Abbildung 50 zeigt die Retentionszeitverschiebungen im Bereich von 0 bis 20 g/l. Die Auftragung zeigt, dass sich die Retentionszeit des As(V)-Peaks bei einer Konzentrationserhöhung des Natriumchlorids von 1 g/l um etwa 1,5 Sekunden verschiebt. Auch bei extrem erhöhten Konzentrationen von bis zu 200 g/l steigt die Verschiebung weiter an, ist aber nicht mehr linear.

Unter Berücksichtigung der Retentionszeitverschiebungen bei hohen Chloridkonzentrationen konnten so auch die stark von dieser Konzentration abhängige As(V)-Spezies in den Deponiewässern über die Retentionszeit unter Berücksichtigung des Chlorid-Gehaltes identifiziert werden.

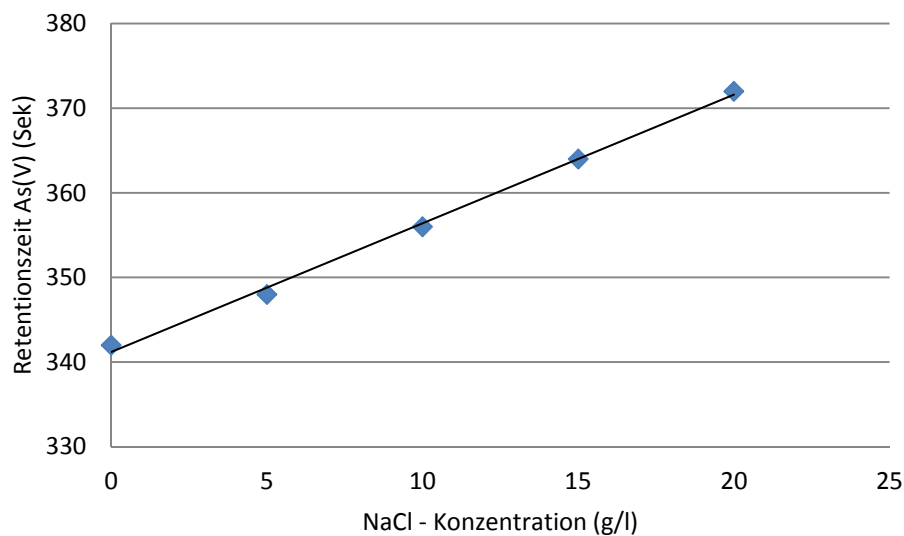


Abbildung 50: Retentionszeitverschiebung von As(V) bei erhöhter NaCl - Konzentration im Bereich von 0 bis 20 g/l.

Eine starke Retentionszeitverschiebung konnten auch Nam *et al.* bei der Arsen-speziierung unter Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA) beobachten (Nam *et al.*, 2006). Obwohl hier sowohl ein anderes Laufmittel, als auch eine andere Säule verwendet wurden, zeigt dies, dass die Retentionszeitverschiebungen kein alleiniges Problem der hier vorgestellten Methode sind.

2.3.2.2 Arsenspezies in Deponiewässern

Die Ergebnisse der Arsen-Speziesanalysen der Deponiewässer aus dem Bereich M sind in Tabelle 30 zusammengefasst. Die Summe der Arsenspezies stimmt hier in vielen Fällen recht gut mit der zuvor bestimmten ges. Arsenkonzentration der

jeweiligen Deponiewasserprobe überein. Die verbleibenden Differenzen zwischen der Summe der einzelnen Spezies und der ges. Arsenkonzentration lassen sich mit an Partikel gebundenem Arsen erklären, welches bei der Speziierung aufgrund der vorangegangenen Filtration der Proben nicht erfasst werden konnte. In vielen Proben konnte As(V) als Hauptspezies nachgewiesen werden, wobei auch Proben vorhanden waren, in denen As(III) dominierte (Probe 2666). Auffallend ist die Teilprobe 3 von Probe 2671: Hier konnte neben As(III) auch ein hoher Anteil (33%) an methylierten Arsenverbindungen festgestellt werden.

Tabelle 30: As-Spezieskonzentrationen (µg/L) in Deponiewässern im Bereich „M“

Probe		As(III)	DMA(V)	MMA(V)	As(V)	Summe As	Ges. As ^{*)}
Nr.	Teilprobe	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
2666	1	0,7	0,3	< 0,3	< 0,3	1,0	2,5
	2	0,5	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,5	1,4
2667	1	0,8	< 0,3	< 0,3	3,1	4,0	9,9
	2	0,6	0,9	0,6	2,5	4,6	12,0
2668	2	1,9	4,6	7,1	< 0,3	13,6	125,8
2671	1	< 0,3	0,3	0,4	0,4	1,1	7,0
	2	0,9	0,3	< 0,3	0,5	1,7	6,5
	3	13,0	11,1	10,7	32,2	67,0	69,4
2698	1	0,6	< 0,3	< 0,3	0,6	1,1	5,6
2699	1	< 0,3	< 0,3	< 0,3	3,3	3,3	8,2
2702	1	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,2	0,2	1,3
2703	1	0,7	0,5	0,5	1,1	2,9	11,5
2705	1	0,5	0,2	0,3	0,5	1,4	7,6
2706	1	0,7	0,3	0,3	0,4	1,6	4,7
2711	1	0,5	0,1	0,2	5,4	6,3	9,3
	2	2,1	4,4	4,8	218,9	230,2	182,8
	3	2,1	2,6	2,3	61,2	68,3	66,4
	4	1,0	0,4	0,4	17,2	19,0	26,6
KB-ZD	2	1,1	2,0	1,4	9,8	14,3	32,3

^{*)}aus Tabelle 29

Die Speziesanalyse in den Deponiewässern aus dem Bereich L zeigte ebenfalls eine deutliche Speziesverteilung. Auch hier waren, neben Arsenit und Arsenat, methylierte Spezies nachweisbar (Tabelle 31).

Tabelle 31: As-Spezieskonzentrationen (µg/L) in Deponiewässern im Bereich „L“

Probe Nr.	Deponie	As(III)	DMA(V)	MMA(V)	As(V)	Summe As	Ges. As ^{*)}
		µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L
2761	O	0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,3	1,4
2762	O	0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,3	1,4
2763	W	3,6	7,3	< 0,3	7,5	18,5	195,8
2764	W	6,0	3,7	5,0	4,9	19,7	119,6
2765	W	0,7	1,2	0,7	8,7	11,2	42,6
2766	W	< 0,3	< 0,3	< 0,3	24,6	24,6	64,8

^{*)}aus Tabelle 28

Auffallend ist die doch große Abweichung zwischen der Summe der einzelnen Spezies und dem As-Gesamtgehalt bei den Proben 2763 und 2764.

Gleiches ist bei Probe 2668 (Bereich „M“) der Fall, auch hier besteht eine auffällige Differenz zwischen der Summe der bestimmten Arsenspezies (14 µg/L) und dem ermittelten ges. Arsen (126 µg/L). Dies lässt sich beim Betrachten des Speziesdiagrammes (Abbildung 51) durch das Auftreten einer unbekannten Arsen-spezies in diesen Proben erklären.

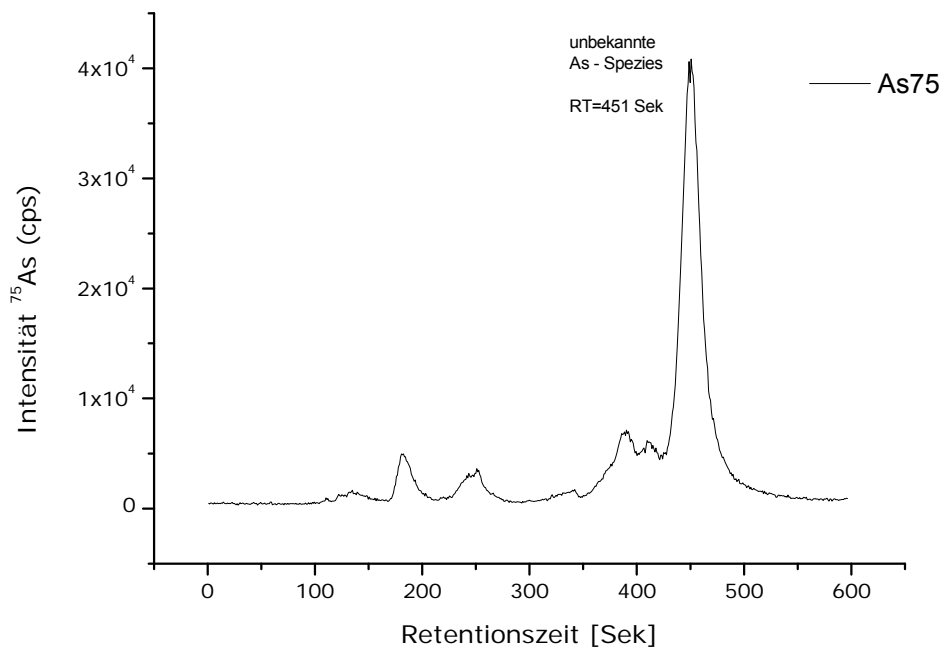


Abbildung 51: Chromatogramm der Probe 2668 (Bereich „M“). Auffallend ist das Auftreten einer unbekannten Arsen-Spezies mit einer Retentionszeit von 451s.

Die semiquantitative Konzentrationsbestimmung dieser unbekannten As-Spezies (unter Annahme einer vergleichbaren Detektier- und Quantifizierbarkeit dieser unbekannten Verbindung im Vergleich zum Arsenat (AsV)) ergibt eine Arsenkonzentration von $86 \mu\text{g As/L}$. Somit ergibt sich für die o.g. Probe durch Summierung der Arsenspezies eine ges. Arsenkonzentration von etwa $100 \mu\text{g As/L}$. Aufgrund der Retentionszeit der unbekannten Spezies (451 Sekunden) liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier um eine As-Thio-Spezies, genauer um Monothioarsenat (MTA(V)), handelt. Vergleichende Messungen auf einer ähnlichen Säule haben gezeigt, dass diese Spezies unmittelbar nach dem Arsenat eluiert (Abbildung 74, Seite 192). Ein direkter Retentionszeitvergleich war leider nicht möglich, da zum Zeitpunkt der Messung der Deponiewässer dieser Thio-standard noch nicht verfügbar war.

Möglicherweise sind in den Proben weitere, unbekannte Arsenspezies enthalten, die nicht detektiert werden konnten. So zeigen einige Chromatogramme im Bereich der Interferenzen, welche durch extrem hohe Chloridkonzentrationen hervorgerufen werden, weitere Signale, die aber nicht eindeutig zugeordnet werden können und aufgrund der Interferenz auch nicht quantifizierbar sind (Abbildung 48, Seite 129). Zusammenfassend ist die Arsenspeziesverteilung in den Deponiewässern aus dem Bereich „M“ im folgenden Diagramm nochmals graphisch dargestellt (Abbildung 52).

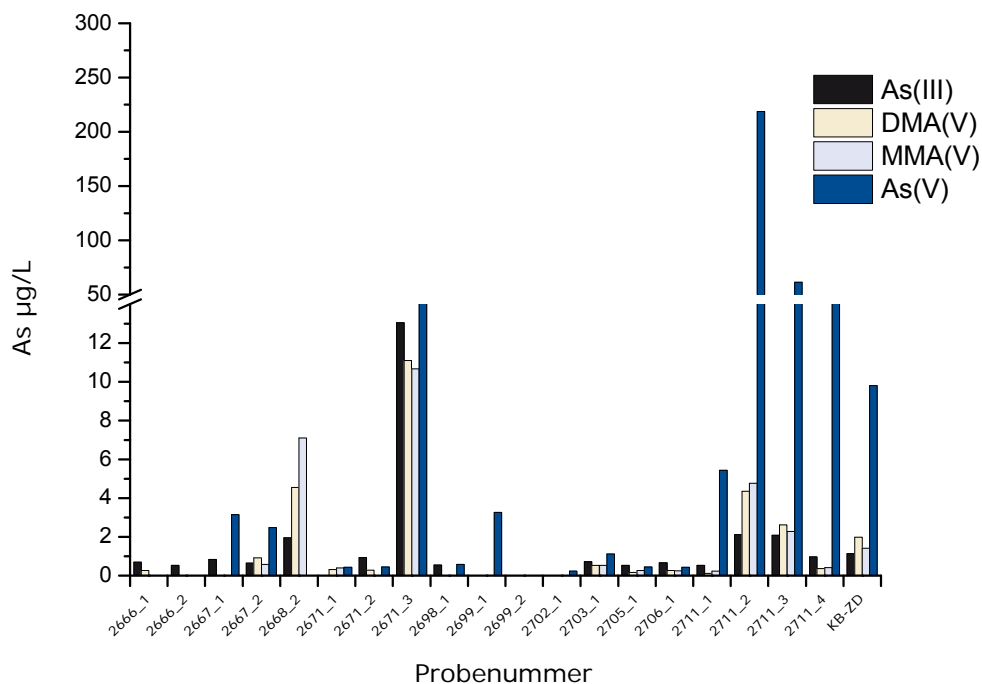


Abbildung 52: Graphische Übersicht der Arsenpezies (µg/L) in Deponiewässern im Bereich „M“.

2.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Übertragung der chromatographischen Methode zur Speziesbestimmung auf die Anwendung auf Deponiewässer ist ein typisches Beispiel dafür, welche Probleme dabei mit der Änderung der Matrix zu beachten sind.

Es konnte gezeigt werden, dass unter Kontrolle der Chloridkonzentration auch in dieser Matrix eine Speziesbestimmung des Arsens möglich ist und welchen Einfluss hohe Chloridkonzentrationen auf die Chromatographie haben. Mit der verwendeten Methode sind so auch andere Anwendungen möglich, wie z.B. die in der Einleitung zu diesem Kapitel beschriebene Speziierung in Grund- und Sickerwasser hochbelasteter Standorte. Hier ist eine Zusammenarbeit und Probennahme am Industriepark Höchst angedacht.

Auch eine Entwicklung der Methode in Bezug auf die Speziierung weiterer Thioarsenverbindungen als Alternative zur häufig verwendeten Ionenaustauscher-Säule erscheint sinnvoll.

3. Permeation metall(oid)organischer Verbindungen durch Arbeitsschutzmaterialien

3.1 Einleitung

Viele Organometall(oid)e, wie Dimethyl- und Diethylquecksilber, Tetramethylzinn, Trimethylarsin oder Tetraethylblei sind für ihre hohe Toxizität bekannt. Besonders der Unfall von Prof. K. Wetterhahn, welche bei der Herstellung eines NMR-Standards wenige Tropfen Dimethylquecksilber auf ihre Latexhandschuhe bekam und einige Monate später an den Folgen dieses Unfalls verstarb (Nierenberg *et al.*, 1998), ist ein immer wieder zitiertes, schreckliches Beispiel für die Wirkung dieser Verbindungsklasse. Allerdings war dies nur einer von vier vorangegangenen, weniger bekannten Dimethylquecksilber Vergiftungen (siehe Kasten auf der rechten Seite). Daher empfiehlt das „U.S. Department of Labor“ für die Handhabung von Dimethylquecksilber die Verwendung von hoch resistenten, mehrschichtigen „SilverShield“[®]-Handschuhen¹⁶ unter langen Neopren- oder Nitrilhandschuhen (U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, Directorate of Science, Technology and Medicine, 1991). Allerdings ist die Handhabung von Pipetten oder Mikroliterspritzen mit dieser Handschuhkombination nahezu unmöglich und macht das Arbeiten mit diesen Standards oftmals noch gefährlicher.

Wetterhahn's tragedy was only the fourth known dimethylmercury poisoning. The other victims were laboratory workers in England who originally synthesized the compound in 1865 (F. Dewhurst, Chemistry in Britain, 25:702, 1989); two secretaries in Canada who inhaled fumes from a leaking vial in a warehouse (Anonymous, Canadian Journal of Public Health, 43:1580, 1943), and a chemist working without adequate protection in Czechoslovakia (J. Pazderova, Int. Arch. Arbeitsmed., 33:323-8, 1974; cited in L. Magos, Metal Ions in Biological Systems, 34:321-70, 1997).

Quelle: R. Lewis (1997) The Scientist, 11 (21) 1

¹⁶ North Safety Products, Hamburg, Deutschland

Viele Stoffe (und gerade auch metall(oid)organische Verbindungen) sind, wie für Dimethylquecksilber beschrieben, in der Lage Arbeitsschutzmaterialien auf molekularer Ebene zu durchdringen (Permeation). Die Permeation schließt dabei verschiedene Vorgänge ein: Zunächst die Aufnahme von Molekülen der Chemikalie in die (äußere) Werkstoffoberfläche, die mit der Chemikalie in Berührung gekommen ist; anschließend die Diffusion der aufgenommenen Moleküle in den Werkstoff; und als letztes die Abgabe der Moleküle von der entgegengesetzten (inneren) Oberfläche des Werkstoffs. Die Dauer zwischen der ersten Anwendung einer Prüfchemikalie auf die äußere Werkstoffoberfläche eines Schutzhandschuhes und ihrem anschließenden Auftreten auf der anderen Seite wird als Durchbruchzeit bezeichnet. Die Durchbruchzeit einer Chemikalie (oder eines Gemisches) wird als erreicht angesehen, wenn die Permeationsrate jedes einzelnen Bestandteiles einen Wert von $1 \mu\text{g} \times \text{cm}^{-2} \times \text{min}^{-1}$ erreicht hat (DIN EN 374-3, 2003). Bei einer Handfläche von etwa 100 cm^2 gilt die Durchbruchzeit also als erreicht, wenn pro Minute $100 \mu\text{g}$ der Chemikalie die Haut erreichen, wobei diese Konzentrationen bei metall(oid)organischen Verbindungen oft schon nach wenigen Sekunden erreicht sein können. Während für die Permeation von Dimethylquecksilber noch Informationen vorhanden sind (Blayney, 2001), vgl. Tabelle 32 gibt es für viele andere, leichtflüchtige metallorganische Verbindungen in

Tabelle 32: Durchbruchzeiten von Dimethylquecksilber

Material	Dicke (mil) ¹⁷	Durchbruchzeit
Nitrile	8	0.25 Minutes
Neoprene	31	<10 Minutes
Butyl	13	<15 Minutes
Viton	11	<10 Minutes
Silver Shield	5	>240 Minutes
Silver Shield & neoprene pair	27	>240 Minutes

(Blayney, 2001)

¹⁷ 1 mil = 1/100 inch = 0,0254 mm

der Literatur nahezu keine Werte für Durchbruchzeiten bzw. Penetrationsraten. Im "Chemical Protection Guide" der SilverShield® Handschuhe wird die Durchbruchzeit für Me₂Hg mit 60 Minuten angegeben (bei 21°C). Für eine Temperatur von 35°C stehen keine Daten zur Verfügung bzw. wurden die Tests nicht durchgeführt (North Safety Products, 2001). Allgemein werden Handschuhe nach zwei verschiedenen Normen getestet: Zum einen nach der US-Norm ASTM F 739, zum anderen nach der europäischen Norm EN 374 (DIN EN 374-3, 2003). Zudem gibt es auch vergleichende Untersuchungen der verschiedenen Testzellen und Normen, die zeigen, dass damit unterschiedliche Permeationsraten ermittelt werden (Mäkelä *et al.*, 2003). Ein weiteres Problem der bestehenden Normen ist die Einteilung der Chemikalien in verschiedene Klassen (A bis L), in denen die Handschuhe mit den jeweiligen Prüfchemikalien getestet werden (vgl. Tabelle 33).

Tabelle 33: Liste der Prüfchemikalien für Einmalhandschuhe

Kennbuchstabe	Prüfchemikalie	CAS-RN	Klasse
A	Methanol	67-56-1	Primärer Alkohol
B	Aceton	67-64-1	Keton
C	Acetonitril	75-05-8	Nitril
D	Dichloromethan	75-09-2	Chloriertes Paraffin
E	Kohlenstoffdisulfid	75-15-0	Schwefelhaltige organische Verbindung
F	Toluol	108-88-3	Aromatischer Kohlenwasserstoff
G	Diethylamin	109-89-7	Amin
H	Tetrahydrofuran	109-99-9	Heterozyklische und Etherverbindungen
I	Ethylacetat	141-78-6	Ester
J	n-Heptan	142-85-5	Aliphatischer Kohlenwasserstoff
K	Natriumhydroxid 40 %	1310-73-2	Anorganische Base
L	Schwefelsäure 96 %	7664-93-9	Anorganische Säure

(DIN EN 374-1, 2003)

Leider lassen sich metall(oid)organische Verbindungen keiner dieser 12 Klassen zuordnen, was die Auswahl der geeigneten Handschuhe beim Arbeiten mit dieser Verbindungsklasse nahezu unmöglich macht. Für den Permeationstest der Einmalhandschuhe werden sowohl in der amerikanischen, als auch in der europäischen Normen mehrere Milliliter (etwa 45 ml in der europäischen Norm EN 347-3) der reinen Prüfchemikalie verwendet. Auch für einen Permeationstest mit metall(oid)organischen Verbindungen (respektive mit Dimethylquecksilber) sind diese Volumina daher notwendig, was die Durchführung dieser Tests aufgrund der hohen Toxizität und Flüchtigkeit dieser Substanzen äußerst gefährlich macht und diese daher in der Regel nicht durchgeführt werden. Betrachtet man nochmals den zuvor geschilderten Unfall von K. Wetterhahn, so stellt man fest, dass das Layout der Tests bzw. der Testkammern, die in den Normen Verwendung finden, den tatsächlichen Vorfällen im analytischen Labor nicht gerecht werden. Während in diesen Tests die gesamte Oberfläche des Handschuhs gegen die Testsubstanz exponiert wird, gelangen in der Analytik in der Regel nur wenige Tropfen auf die Handschuhoberfläche. Zudem befindet sich die Hand bei diesen Arbeiten in einem Abzug, was zur Folge hat, dass sich ein großer Luftraum (Headspace) über diesem Tropfen befindet, und somit aufgrund der Körperwärme ein Großteil der zumeist leichtflüchtigen Substanz zumindest teilweise verdunsten kann. Weiterhin ist die Permeabilität stark von der Temperatur abhängig. So beträgt z.B. die Durchbruchzeit von Dipenten bei einer Testtemperatur von 23°C mehr als 480 Minuten. Bei einer typischen Handschuhtemperatur von 35°C beträgt die Durchbruchzeit hingegen lediglich 36 Minuten (Packham, 2006). Für metall(oid)organische Verbindungen wie Dimethylquecksilber beträgt diese Permeationszeit bei 21°C lediglich wenige Sekunden!

Auch bei den amerikanischen und europäischen Normen werden die Tests bei 25°C (ASTM F 739-99a, 1999) bzw. 23°C (DIN EN 374-3, 2003) durchgeführt. Wie bereits oben kurz beschrieben liegen aber die tatsächlichen Hand / Handschuhtemperaturen deutlich über diesen Werten (Aschoff *et al.*, 1958).

Permeation ist, wie oben beschrieben, die molekulare Durchdringung durch das Handschuhmaterial. Die Zeit, die die Chemikalie hierfür benötigt, wird in Klassen eingeteilt (Tabelle 34).

Tabelle 34: Schutzindex für Handschuhe nach EN 374-1:2003

Durchbruchszeit (min)	Schutzindex
>10	Klasse 1
>30	Klasse 2
>60	Klasse 3
>120	Klasse 4
>240	Klasse 5
>480	Klasse 6

(DIN EN 374-1, 2003)

In Anbetracht der extremen Toxizität vieler metall(oid)organischer Verbindungen, deren zumeist hohe Flüchtigkeit sowie den zu vermutenden raschen Durchbruchzeiten sollen diese Verbindungen (im Einzelnen: Dimethylquecksilber (Me_2Hg), Tetramethylzinn (Me_4Sn), Trimethylgermaniumchlorid (Me_3GeCl), Dimethylarsiniodid (Me_2AsI) und Trimethylbismut (Me_3Bi)) mit Hilfe einer neu zu entwickelnden Permeationszelle untersucht werden. Im Gegensatz zu den konventionellen Testzellen soll hier nur ein einzelner Tropfen der metall(oid)organischen Verbindung auf die Oberfläche der verschiedenen Handschuhmaterialien aufgebracht werden. Außerdem soll die Zelle so konstruiert sein, dass die Temperatur der Haut berücksichtigt werden kann sowie ein Gasraum vorhanden ist, in den ein Teil der Prüfsubstanz verdampfen kann. Da mit recht geringen Durchbruchsraten zu rechnen ist, ist es notwendig ein hochempfindliches Detektionssystem zu verwenden. Da es sich bei den Testsubstanzen um metall(oid)organische Verbindungen handelt, ist ein induktiv gekoppeltes Plasma Massenspektrometer (engl. Inductively Coupled Plasma / Mass Spectrometry, ICP-MS) das bevorzugte System. Das Prinzip des ICP-MS wurde bereits in Kapitel 3.2 (allgemeiner Teil, ab Seite 40) beschrieben.

3.2 Permeationszelle

Aus den in der Einleitung beschriebenen Gründen wurde eine neue Permeationszelle entwickelt. Diese Zelle ist aus zwei Glas-Halbkugeln (Abbildung 53) aufgebaut, wie es in ähnlicher Weise auch in den Normen der Fall ist. Das Testmaterial kann zwischen den Planschliffen (NS 80) am oberen und unteren Teil der jeweiligen Zell-Halbkugeln eingespannt und mittels eines Schnellverschlusses fixiert werden. Die neu eingebaute Heizspirale ist so in direktem Kontakt mit der Handschuhprobe. Dies wird erreicht, indem die Heizspirale um etwa 1 mm höher angebracht ist als der Planschliff des unteren Zellenteils.

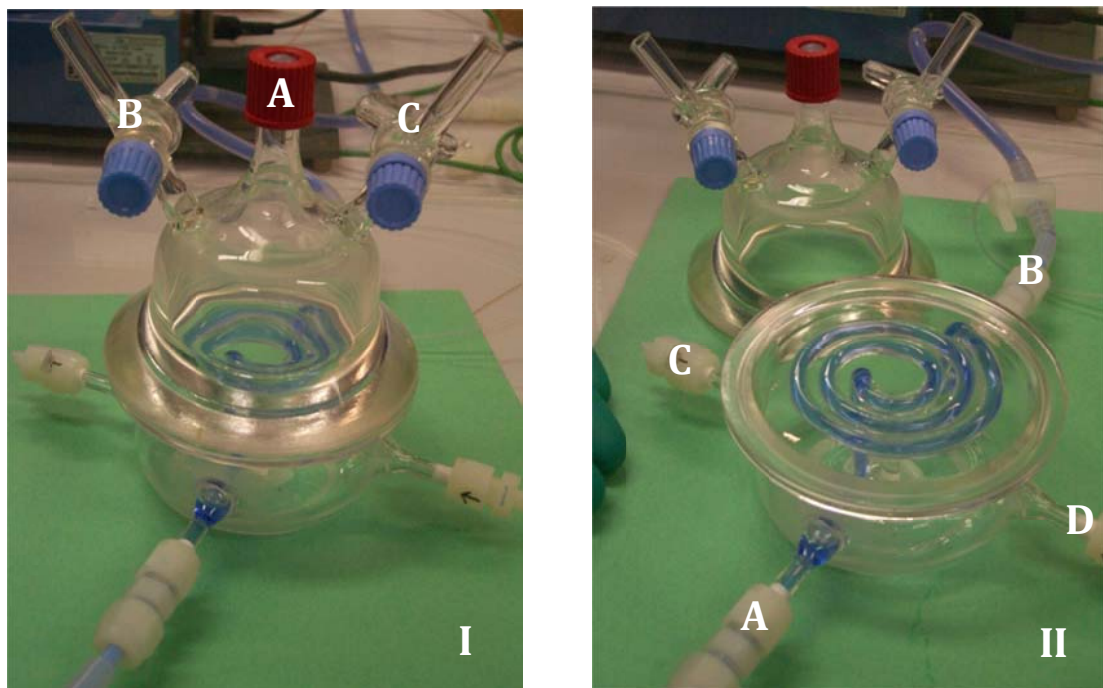


Abbildung 53: Geschlossene (I) und offene Permeationszelle (II). Die Handschuhproben werden zwischen den oberen und unteren Schliff der Zelle so platziert, dass sich die Heizspirale direkt unterhalb des Probenstückes befindet. Abbildung I: Septum zur Injektion der Probensubstanz (A); B und C: Headspace Ventile. Abbildung II: Anschlüsse für Heizflüssigkeit (A und B) sowie für Proben-gas Ein- (D) und Auslass (C).

Die Heizspirale wurde installiert um die Adern und die Temperaturverteilung in der Hand bzw. auf dem Testmaterial simulieren zu können. Der untere Teil der

Testzelle wurde mit vier Swagelok®-Anschlüssen versehen (Abbildung 53 II)¹⁸. Die Anschlüsse (A und B) dienen dem Zufluss der Heizflüssigkeit (Flussrate: 35 ml/Min., blau gefärbtes Wasser). Während der Messung wurde die Heizflüssigkeit auf 35°C eingestellt, was der Temperatur entspricht, die auch zwischen der Hautoberfläche und dem Handschuh gemessen werden kann (Packham, 2006). Die Temperaturmessung erfolgt mittels eines Voltcraft® K204 Dataloggers, zum einen im Vorratsgefäß der Heizflüssigkeit, zum anderen direkt hinter dem Ausgang der Heizspirale. Die Temperaturdifferenz zwischen diesen Messpunkten beträgt weniger als ein Grad Celsius. Die Anschlüsse C und D sind als Trägergas (Helium) Ein- und Auslass vorgesehen. Der Auslass der Testkammer wurde mittels einer 1/16“ Kapillare (CS-Chromatographieservice, Langerwehe, Germany) an ein ICP-MS (Agilent®7500a) als elementsensitiven Detektor gekoppelt. Mit dem Trägergas werden permanent die den Handschuh durchdringenden Metall(oid)spezies zum Detektor transportiert. Die Flussrate beträgt 20 ml/min.

Der obere Teil der Testkammer (Permeationszelle) ist mit einer Schraubkappe mit Septum (Abbildung 53 I, A) sowie mit einem Gasein- und Gasauslass (Abbildung 53 I, B und C) versehen. Die Injektion der Testsubstanzen kann so durch das Septum direkt in die Mitte des Handschuhs mit der darunter liegenden Heizspirale erfolgen. Nach der Messung kann der Gasraum über die Gasanschlüsse (B und C) belüftet und die Testkammer so gefahrlos im Abzug gereinigt werden. Zudem kann auf diese Weise auch ein Volumenstrom simuliert werden, wie er auch beim Arbeiten im Abzug vorhanden ist.

Aufgrund der hohen Toxizität der Verbindungen, insbesondere von Dimethylquecksilber, wurde die gesamte Apparatur in einer „Glove-Box“ mit angeschlossener externer Abluft aufgebaut (Abbildung 54). Nach jeder Messung wurde die gesamte Messkammer zunächst gut gelüftet, die Zelle anschließend mit Methanol und Ethanol gereinigt und bei Raumtemperatur im sauberen Abzug getrock-

¹⁸ An dieser Stelle möchte ich mich bei den Glasbläsern der Universität Duisburg-Essen R. Schmidt und HJ Barth bedanken, die bei der Realisierung und der Konstruktion der Messzelle eine große Hilfe waren.



Abbildung 54: Glove-Box mit Permeationszelle, angeschlossen an ein ICP-MS.

net. Vor den Messungen mit metall(oid)organischen Verbindungen wurde ein Blindwert der Messzelle aufgenommen, bei dem zwar der entsprechende Handschuh in der Zelle installiert war, aber keine Testsubstanzen aufgegeben wurden.

3.3 Chemikalien und metall(oid)organische Standards

Falls nichts anderes angegeben wurde, wurden nur Reagenzien von anerkannter Analysenqualität (analytical Grade) verwendet. Metallorganikstandards wurden in Methanol angesetzt (Acros organics, Geel, Belgium) und auf 1 g/l als typische Labor-Standardkonzentration verdünnt. Aufbewahrt wurden die Lösungen im Kühlschrank bei 4°C und vor Licht geschützt.

Dimethylquecksilber (Me_2Hg , 98%) und Tetramethylzinn (Me_4Sn , 98%) wurden bei Strem (Newburyport, US), Trimethylgermaniumchlorid (Me_3GeCl , 98%) bei ABCR (Karlsruhe, Germany) gekauft. Dimethylarsiniodid (Me_2AsI) stammt von Argus (Vernio, Italy). Trimethylbismut (Me_3Bi) wurde bei Vezerf (Idar-Oberstein, Germany) synthetisiert. Als interner Rhodiumstandard (CertiPUR®) wurde eine 1 g/l Lösung von Merck (Darmstadt, Germany) verwendet. Die Verdünnung der Lösung erfolgte mit ultra-reinem Wasser (18.2 MΩ cm). Der Lösung wurden 2% Salpetersäure (subboiled) hinzugefügt. Als Trägergas wurde Helium verwendet (He 5.0, Air liquide, Duisburg, Germany).

3.4 Instrumente / Detektor

Wie bereits im Kapitel zuvor beschrieben, wurde der Gasauslass der Permeationszelle mittels einer 1/16" Kapillare an das ICP-MS (Agilent® 7500a, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) gekoppelt (Flussrate: 20 ml min⁻¹). Das Gerät ist mit einem Micro Flow Nebulizer MFN100 aus Fluoropolymeren (Agilent) sowie einer Standardsprühkammer (Quartz, Agilent) ausgestattet.

Tabelle 35: ICP-MS Parameter (Agilent® 7500a)

Parameter	Einheit / Modell
Zerstäuber	Micro Flow Nebulizer MFN100
Fackel	„Inert Torch“ Innendurchmesser : 2,5 mm
Software	Chemstation G1834B
Zerstäuber	Micro Flow Nebulizer MFN100
Argon flow	15 l/min
Carrier gas	0.8 l/min
Makeup gas	0.4 l/min
RF power	1580 W
Sampling depth	4.6 mm
Peristaltic pump	0.08 rpm

Die verwendeten ICP-MS Parameter sind in Tabelle 35 aufgeführt. Als ICP-Tunelösung wurde ein Multielement-Standard (Li, Ce, Ti, Y, Co) mit einer Konzentration von 10 µg/l in 2% HNO₃ (subboiled) verwendet; angesetzt aus den jeweiligen, zertifizierten 1g/l Stammlösungen. Als Performance-Test der ICP-MS wurde täglich ein neuer „Tune-Report“ erstellt. Zur Detektion der Metall(oid)e wurden die folgenden Masse zu Ladungsverhältnisse (m/z) zeitaufgelöst („time resolved“) aufgezeichnet: ¹³C; ⁷²Ge; ⁷⁴Ge, ⁷⁵As; ¹¹⁸Sn; ¹²⁰Sn; ²⁰⁰Hg; ²⁰²Hg; ²⁰⁹Bi ¹⁹.

¹⁹ als monoisotopische Elemente können Arsen und Bismut ausschließlich auf den Massen ⁷⁵As (m/z=75) bzw. ²⁰⁹Bi (m/z=209) detektiert werden.

3.5 Experimenteller Teil

3.5.1 Proben / Handschuhmaterialien

Untersucht wurden fünf verschiedene Laborhandschuhe. Drei dieser Handschuhe waren typischerweise im Labor verwendete Einmalhandschuhe aus Latex, Vinyl bzw. Nitril (Tabelle 36, Nummer 1 bis 3). Die Handschuhe dürfen bei einem Test der Luft- und Wasserdichtigkeit keine Leckagen aufweisen. Diese Prüfung erfolgt anhand des AQL-Werts (Akzeptables Qualitäts Level). Alle verwendeten Handschuhe besitzen einen AQL-Wert von <1,5. Bei den weiteren Handschuhmaterialien handelt es sich um spezielle Chemikalienschutzhandschuhe aus 5-lagigem Kunststoff-Hochleistungslaminat (Tabelle 36, Nummer 4 und 5).

Tabelle 36: Getestete Handschuhmaterialien

Nummer	Handschuh	Material	Dicke
1	Mediversal®	Latex	k.A.
2	Rotiprotect®	Vinyl	k.A.
3	VWR®	Nitrile	k.A.
4	Northern Safety SilverShield® / 4H	Norfoil®	2.7 mil (0,065mm)
5	Ansell Admont	Barrier®	2.5 mil (0,062mm)

3.5.2 Totzeit

Zur Totzeitbestimmung wurde die Penetrationszelle durch ein T-Stück mit Septum ausgetauscht. Das Trägergas der Zelle wurde direkt an das T-Stück angeschlossen und eine Trägergasgeschwindigkeit von 20 ml/min eingestellt, welcher später auch für die Messungen mit eingebauter Penetrationszelle verwendet wurde. Von jedem Metall(oid)-Standard Me_4Sn , Me_2Hg , Me_3GeCl , Me_3Bi und Me_2AsI (Konzentration 10 pg/ μl) wurde, bei gleichzeitigem Start der ICP-MS, je

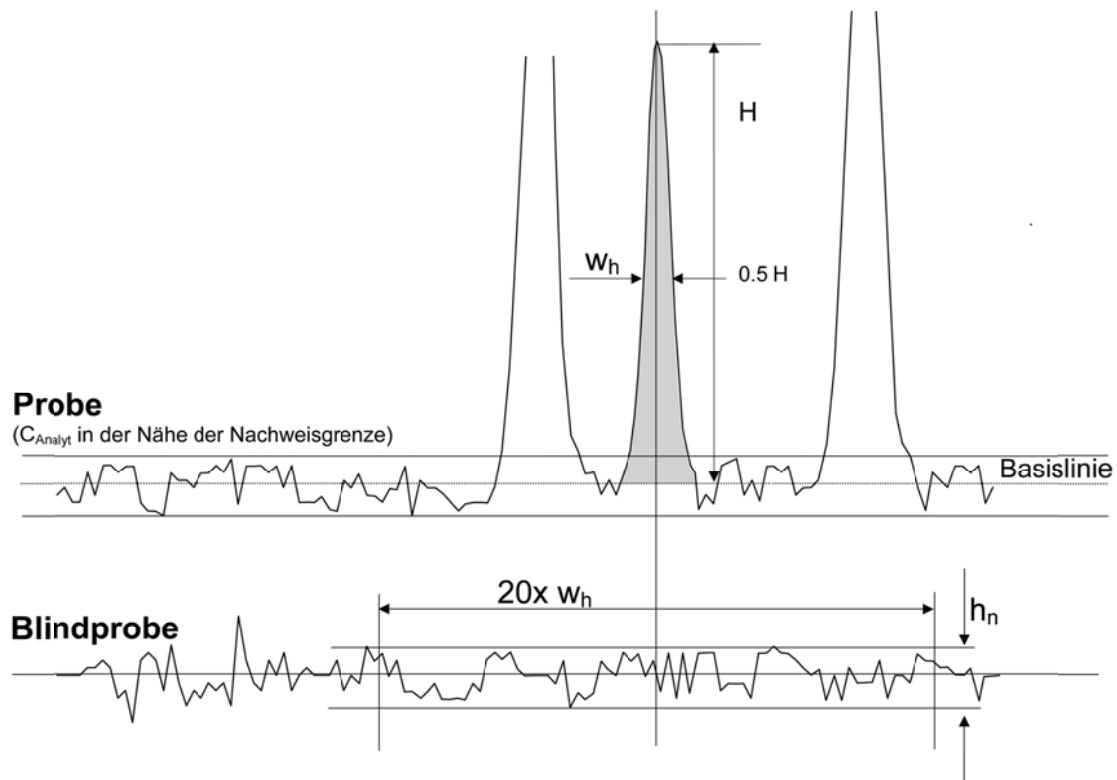
1 µl durch das Septum in das T-Stück injiziert. Die Totzeit wurde definiert als Zeit zwischen der Injektion und dem ersten Signalanstieg im Detektionssystem.

3.5.3 Nachweisgrenzen und Kalibration

In der Chromatographie kann die Nachweisgrenze (NG) über das Signal/Rausch-Verhältnis ermittelt werden. Als Rauschen (noise) wird dabei die Differenz zwischen dem größten und dem kleinsten Messpunkt im betrachteten Chromatogrammabschnitt bezeichnet (Chromatogramm der Blindprobe bzw. peakfreier Abschnitt in der Nähe des zu beurteilenden Peaks im Chromatogramm der Analysenprobe) (Stauffer, 2008). Die Nachweis-, Erfassungs- oder Bestimmungsgrenze wird als Vielfaches des Rauschens (in positiver oder negativer Richtung von der Basislinie aus gesehen = $N/2$) angegeben, welche der Peak mindestens aus der Basislinie herausragen muss (Abbildung 55). Die Nachweisgrenze ist somit abhängig vom mittleren Blindwert (\bar{x}_B) und dessen Standardabweichung (σ_B) (Kunze *et al.*, 2009).

Für die Nachweisgrenze (NG) wird in der Regel ein Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) von 3:1 angewendet (in einigen Publikationen sogar von nur 2:1), für die Erfassungsgrenze ein Wert von 6:1 und für die Bestimmungsgrenze (BG) ein S/N von 10:1.

$$NG = \bar{x}_B + 3 \sigma_B$$



(Stauffer, 2008)

Abbildung 55: Berechnung des Signal/Rausch-Verhältnisses: S/N = Signal/Rausch-Verhältnis, H = Höhe des gemessenen Peaks (Basislinie bis Peakspitze) und h_n = größte Schwankung der Basislinie im Bereich von 5–20 Halbwertsbreiten (w_h) gemessen am Chromatogramm einer Blindprobe.

Zur Kalibration wurden verschiedene Mengen der einzelnen Spezies über das in Kapitel 3.5.2 beschriebene T-Stück in den Trägergasstrom injiziert und die Peakflächen anschließend integriert.

3.5.4 Permeationsversuche / Permeationszeiten

Um die Vergleichbarkeit der hier neu gestalteten Messzelle mit dem europäischen (DIN EN 374) und dem amerikanischen Standard (ASTM F739) belegen zu können, wurde zunächst mit der Messung der Permeationszeit von Dimethylquecksilber (Me_2Hg) für Latexhandschuhe begonnen. Dazu wurde eine Probe

des Latexhandschuhs in die Messzelle installiert, diese verschlossen und 10 Minuten gewartet, damit sich eine konstante Temperatur zwischen Heizspirale und Handschuhmaterial einstellen konnte. Anschließend wurden, bei gleichzeitigem Start des ICP-MS, 10 µl des Me_2Hg Standards (1g/l) durch das Septum auf die Handschuhoberfläche injiziert. Für die Ermittlung der Permeationszeiten von Me_2Hg durch Vinyl, Nitril, Norfoil® und Barrier® Handschuhproben wurde dieses Verfahren entsprechend wiederholt. Auch für die weiteren metall(oid)organischen Verbindungen (Me_4Sn , Me_3GeCl , Me_3Bi und Me_2AsI) wurde mit jedem Handschuhmaterial entsprechend verfahren. Dabei wurde sorgfältig auf die Einhaltung der Äquilibrationszeit von 10 Minuten, der Handschuhtemperatur sowie auf eine gleichmäßige, schwache Dehnung der Probe geachtet.

3.6 Ergebnisse und Diskussion

3.6.1 Totzeiten

Die Totzeiten wurden, wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben, für die Analyten Me_2Hg , Me_4Sn , Me_3GeCl , Me_2AsI und Me_3Bi bestimmt. Aufgrund der unterschiedlichen Siedepunkte und Dampfdrücke der einzelnen Verbindungen variieren die Totzeiten der Testsubstanzen leicht zwischen 2,5 und 3 Sekunden.

3.6.2 Nachweisgrenzen und Kalibration

Die Nachweisgrenze (NG) der jeweiligen Testsubstanzen wurde über das Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) (Kapitel 3.5.3) der entsprechenden Massenspur (CPS) des ICP-MS einer Blindprobe (noise) sowie der Massenspur (Peak, CPS) des jeweiligen Standards (10 pg) nahe der Nachweisgrenze ermittelt. Für die Nachweisgrenze (NG) wurde ein Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) von 3:1 angewendet (drei Sigma-Kriterium).

$$NG = \bar{x}_B + 3 \sigma_B$$

Die Nachweisgrenzen sind in Tabelle 37 für die verwendeten Standards aufgelistet.

Tabelle 37: Nachweisgrenzen des ICP-MS beim Permeationstest

Verbindung	Nachweisgrenze (pg)
Me_4Sn	0,1
Me_3GeCl	2,2
Me_2AsI	0,9
Me_3Bi	0,7

Für die Bestimmungsgrenze (BG) gilt allgemein: $\bar{x}_B + 9 \sigma_B$. Auf die Berechnung wurde bewusst verzichtet.

Aus den ermittelten Peakflächen nach der Injektion der einzelnen Standards (vgl. Kapitel 3.5.3) wurden die Kalibrationsgeraden zur Quantifizierung der Permeationsraten erstellt. Beispielhaft sind in Abbildung 56 die Geraden für Me_3GeCl und Me_4Sn dargestellt.

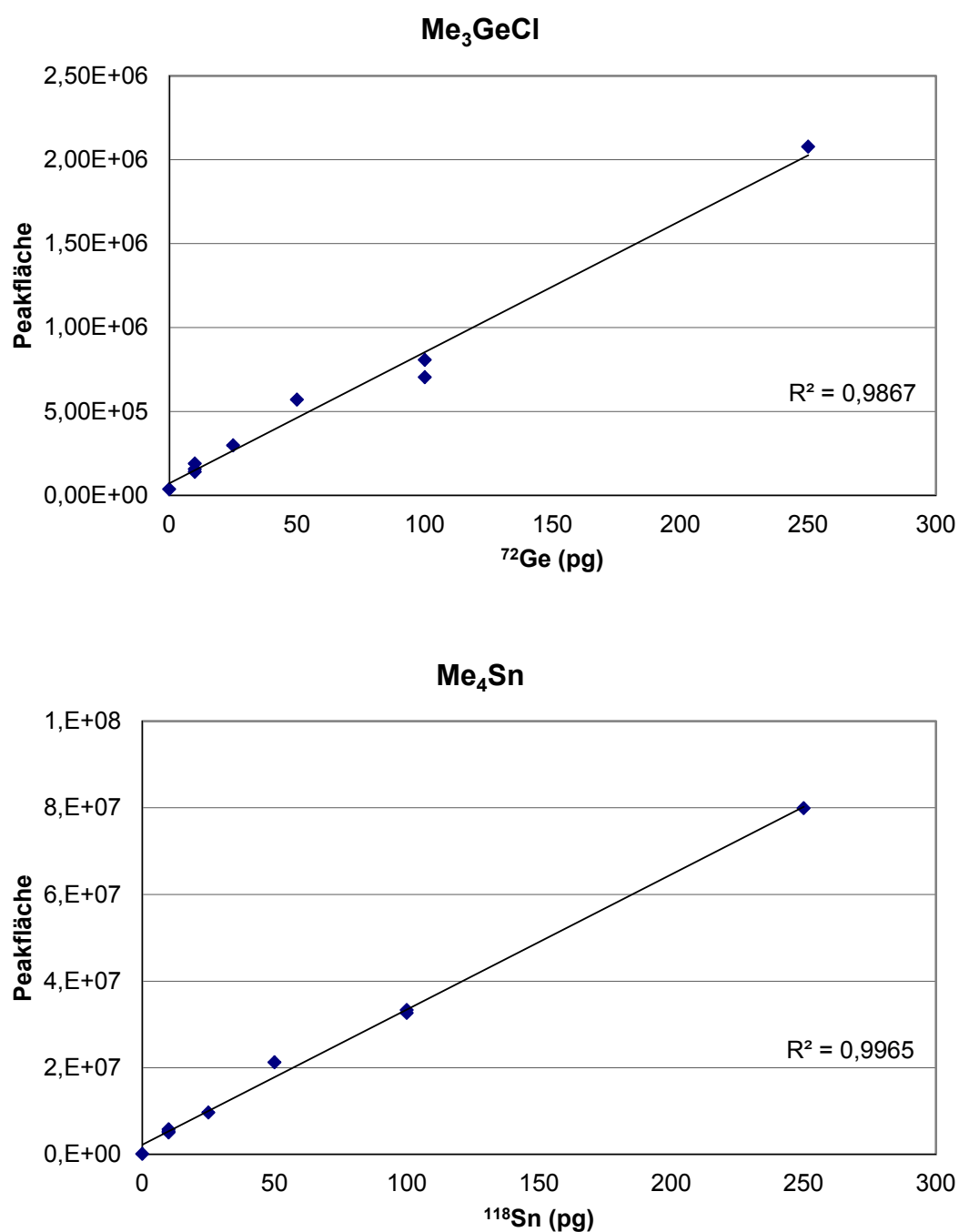


Abbildung 56: Kalibrationsgeraden, für Me_3GeCl (oben) und Me_4Sn (unten) zur Quantifizierung der Permeationsraten mit Bestimmtheitsmaß (R^2).

3.6.3 Durchbruchzeiten / Permeationszeiten

Um die Vergleichbarkeit der hier neu gestalteten Messzelle mit dem europäischen (EN 374) und dem amerikanischen Standard (ASTM F739) belegen zu können, wurde zunächst mit der Messung der Permeationszeit von Dimethylquecksilber (Me_2Hg) für Latexhandschuhe begonnen. Abbildung 57 zeigt den zeitlichen Verlauf der detektierten Hg-Menge nach der Injektion von $10\mu\text{l}$ eines 1g/l Me_2Hg Standards. Der Test wurde nach einer Laufzeit von 100 Sekunden gestoppt um eine schlecht zu entfernende Überladung / Kontamination der Testzelle sowie des ICP-MS und der Transferline zu vermeiden.

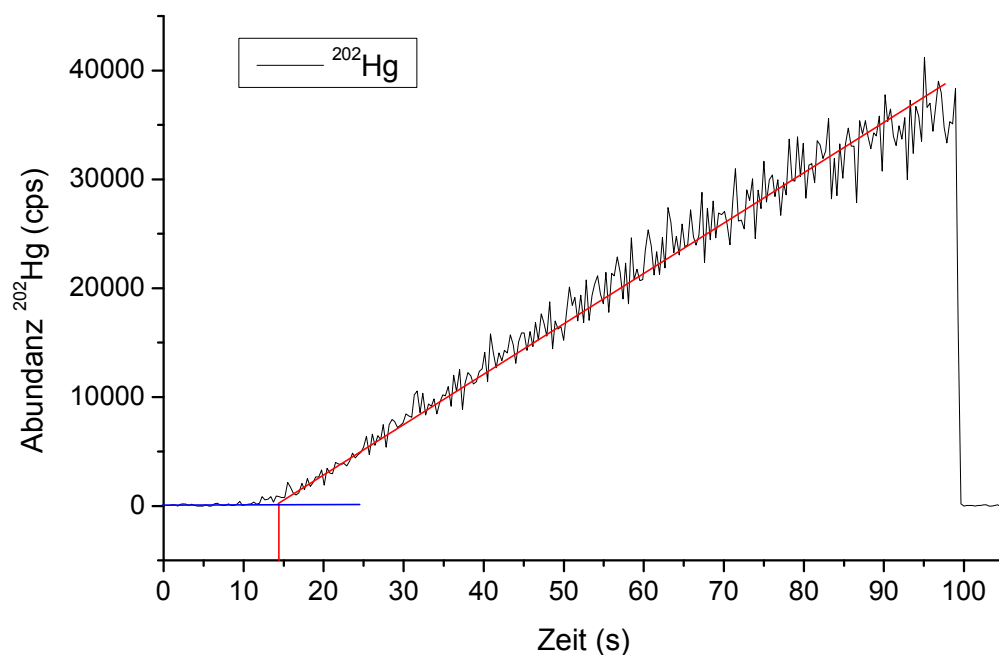


Abbildung 57: Durchbruchzeit von Me_2Hg für einen Latex-Einmalhandschuh nach Aufgabe von $10\mu\text{l}$ einer 1g/l Lösung auf die Handschuhoberfläche. Die Durchbruchzeit beträgt etwa 11 Sekunden (14 Sekunden abzüglich der Totzeit von 3 Sekunden).

Aus dem Chromatogramm (Abbildung 57) kann eine Durchbruchzeit von 14 Sekunden abgeleitet werden (Schnittpunkt der Basislinie (blau) mit dem Anstieg des Hg-Signals (rot)). Allerdings muss hier noch die systembedingte Totzeit von

3 Sekunden (Kapitel 3.5.2) in Abzug gebracht werden, was somit einer Durchbruchzeit von 11 Sekunden für Me₂Hg durch den Latexhandschuh ergibt. Permeationstests, durchgeführt von unabhängigen Testlaboratorien, haben für Me₂Hg eine Durchbruchzeit innerhalb von 15 Sekunden durch Latexhandschuhe ergeben (Blayney, 2001), was einer sehr guten Übereinstimmung mit der hier neu entwickelten Permeationszelle entspricht.

Nachdem für die hier verwendete Permeationszelle für Me₂Hg, verglichen mit den in den verschiedenen Normen eingesetzten Zellen festgestellt wurde, dass diese vergleichbare Durchbruchzeiten liefern, wurden die Bestimmungen auf die anderen Handschuhmaterialien (Vinyl, Nitril, Norfoil® und Barrier®) erweitert.

Die Tests wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt. Für die Einmalhandschuhe aus Nitril ergab sich eine Durchbruchzeit von 200 Sekunden. Auch hier wurde die Messung zum Schutz des Systems vor Überladung nach 18 Minuten (1080 Sekunden) abgebrochen (Abbildung 58). Im Gegensatz zu den in der Literatur angegebenen Durchbruchzeiten von 15 Sekunden (Blayney, 2001) für Nitrilhandschuhe wurde hier eine wesentlich höhere Durchbruchzeit (200 Sekunden) ermittelt. Dies lässt sich auf die abweichenden Testbedingungen zurückführen. Während bei den bekannten Testverfahren mehrere Milliliter der Reinsubstanz verwendet werden, welche die gesamte Oberfläche des Testmaterials zu jeder Zeit des Experimentes benetzen (vollständige Füllung der oberen Testkammer), wurden in der hier verwendeten Testzelle lediglich 10 µl Standard auf die Oberfläche aufgegeben, was einer Laborsituation entspricht, bei der geringe Mengen (Spritzer) auf den Handschuh gelangen. Aufgrund der höheren Temperatur (35°C zu 25°C) und des über der Testflüssigkeit befindlichen Gasraumes verdunsteten die leichtflüchtigen metall(oid)organischen Verbindungen innerhalb der Testzeit fast vollständig, was zu einer späteren Durchbruchzeit führt.

Die Tests mit den Norfoil® und Barrier® Materialien wurden analog zu den o.g. Tests durchgeführt und zeigten auch nach einer Expositionszeit von mehr als 25 Minuten keine Durchdringung.

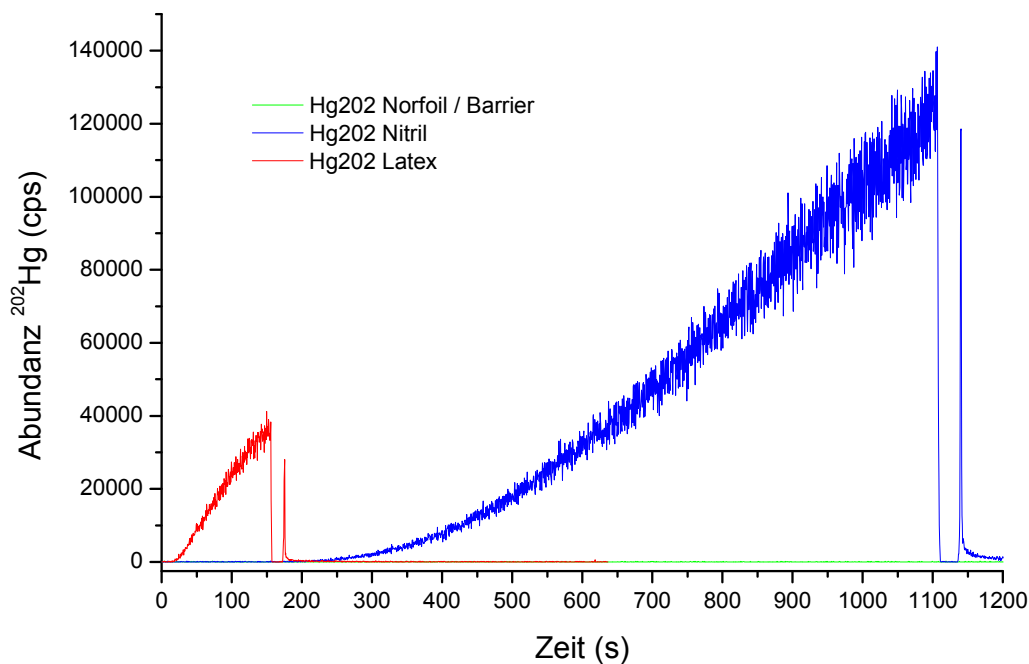


Abbildung 58: Durchbruchzeiten von Me_2Hg durch Latex, Nitril und SilverShield (Norfoil®) bzw. Ansell (Barrier®) Handschuhmaterialien nach Aufgabe von $10\ \mu\text{l}$ eines $1\ \text{g/l}$ Standards. Die Signale am Ende einer jeden Messung (175 / 1140 Sekunden) entstehen durch das Abkoppeln der Messzelle vom Detektor.

Die Latex-Einmalhandschuhe wurde ebenfalls auf die Permeabilität von Tetramethylzinn (Me_4Sn), Trimethylgermaniumchlorid (Me_3GeCl), Dimethylarsiniodid (Me_2AsI) und Trimethylbismut (Me_3Bi) getestet. Sie wurden von fast jeder Testsubstanz in weniger als einer Minute deutlich messbar durchdrungen. Im Einzelnen: Von Me_3Bi in 30 Sekunden, von Me_2AsI in 40 Sekunden und von Me_4Sn in 50 Sekunden. Nur bei Me_3GeCl betrug die Durchbruchzeit etwas mehr als eine Minute (75 Sekunden). Der Permeationsverlauf ist in Abbildung 59 dargestellt.

Zusätzlich wurde auch das ^{13}C Signal aufgenommen, was eine Kontrolle der Durchbruchzeit des als Lösungsmittel verwendeten Methanols ermöglicht (Kurve nicht dargestellt). Für Methanol konnte so eine Durchbruchzeit von 45 Sekunden ermittelt werden, was mit der im Handschuhmerkblatt der Uni Freiburg angegebenen Durchbruchzeit von 50 Sekunden gut übereinstimmt (Universität Freiburg, 2012).

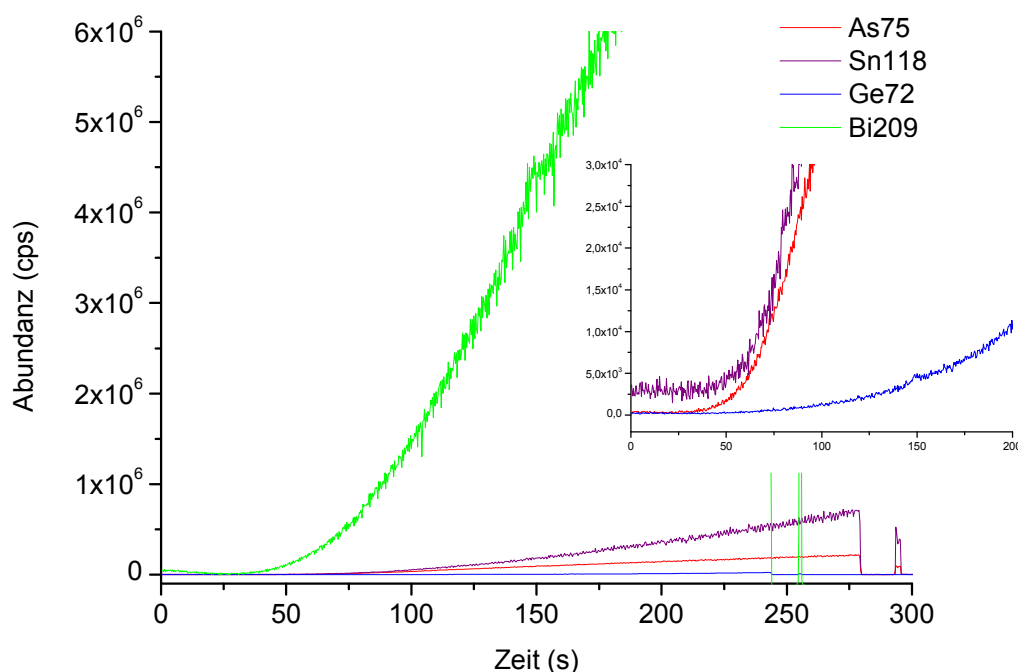


Abbildung 59: Permeation von Me_3Bi (30 Sekunden), Me_2AsI (40 Sekunden), Me_4Sn (50 Sekunden) und Me_3GeCl (75 Sekunden) durch Latexhandschuhe nach Aufgabe von $10 \mu\text{l}$ eines 1 g/l Standards.

Weiterhin wurden die Durchbruchzeiten der oben genannten Verbindungen auch für Einmal-Vinylhandschuhe bestimmt (Abbildung 60). Auch Vinylhandschuhe wurden in kürzester Zeit von allen getesteten Chemikalien durchdrungen. Wie Abbildung 60 zeigt ist hier die Durchbruchzeit im Vergleich zu den zuvor getesteten Latexhandschuhen für Dimethylquecksilber (Me_2Hg) sogar

noch eine Sekunden kürzer (10 Sekunden). Auch alle weiteren Testsubstanzen durchdringen das Material in weniger als einer Minute!

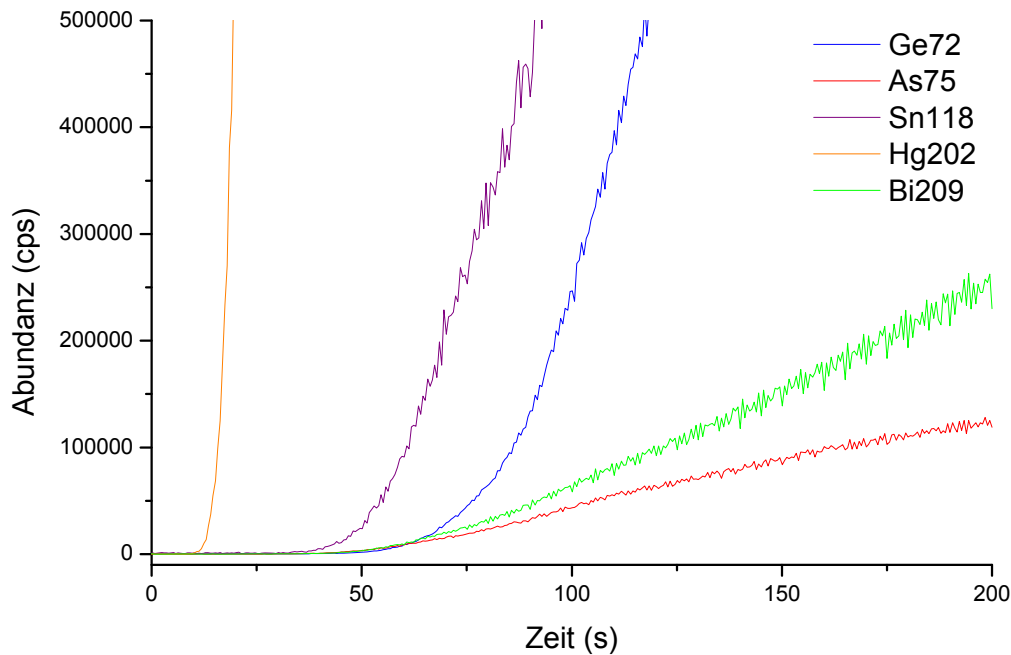


Abbildung 60: Permeation von Me_2Hg (10 Sekunden), Me_4Sn (35 Sekunden), Me_3GeCl (45 Sekunden), Me_2AsI (45 Sekunden) und Me_3Bi (45 Sekunden) durch Vinylhandschuhe nach Aufgabe von 10 μl eines 1 g/l Standards.

Wesentlich spätere Durchbruchzeiten zeigten sich beim Test von Nitril-Einweghandschuhen, bei denen bei einer Messzeit von bis zu 1000 Sekunden lediglich Dimethylquecksilber (Me_2Hg) und Trimethylbismut (Me_3Bi) dieses Material messbar durchdrangen. Für die anderen Substanzen konnte bis zu diesem Zeitpunkt keine Permeation nachgewiesen werden (Abbildung 61).

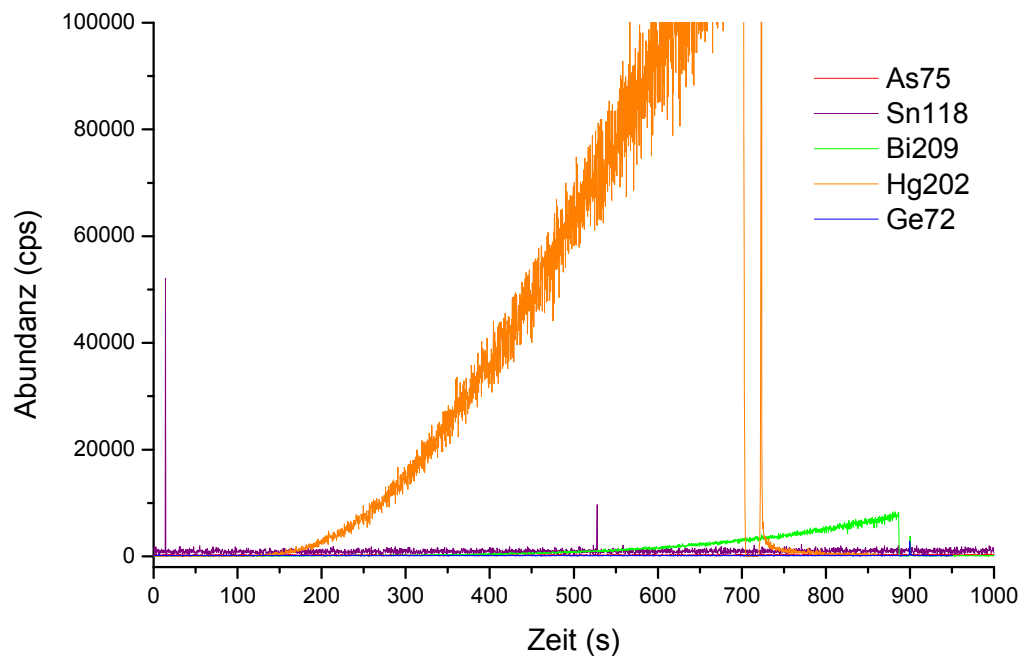


Abbildung 61: Permeation von Me_2Hg (10 Sekunden), Me_4Sn (35 Sekunden), Me_3GeCl (45 Sekunden), Me_2AsI (45 Sekunden) und Me_3Bi (45 Sekunden) durch Nitrilhandschuhe nach Aufgabe von $10\ \mu\text{l}$ eines $1\ \text{g/l}$ Standards.

Die Ergebnisse der bestimmten Durchbruchzeiten der metall(oid)organischen Verbindungen für die verschiedenen Handschuhmaterialien sind in der folgenden Tabelle 38 nochmals zusammenfassend dargestellt. An dieser Stelle soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass es sich bei den angegebenen Durchbruchzeiten für Standardlösungen mit einer Konzentration von $1\ \text{g/l}$ in Methanol und nicht, wie in den vorhandenen Normen üblich, der Reinsubstanzen handelt!

Tabelle 38: Zusammenfassung der Durchbruchzeiten verschiedener Handschuhtypen und metall(oid)organischen Verbindungen bei 35 °C

	Durchbruchzeit (s)				
	Latex	Vinyl	Nitril	Norfoil®	Barrier®
Me ₂ Hg	11	10	120	>> 1000	>>1000
Me ₄ Sn	50	35	> 1000	>> 1000	>> 1000
Me ₃ GeCl	65	45	> 1000	>>1000	>> 1000
Me ₂ AsI	40	45	> 1000	>> 1000	>> 1000
Me ₃ Bi	30	45	250	>> 1000	>> 1000

3.6.4 Permeationsraten

Da hier ein gasförmiges Sammelmedium (Helium) verwendet wurde, wurde ein s.g. „offener Kreislauf“ zur Messung der Permeation verwendet (DIN EN 374-3, 2003). Hier wird das Sammelmedium nach der Prü fzelle nicht wieder in diese eingeleitet (was bei Verwendung des ICP-MS ohnehin nicht möglich wäre).

Die Berechnung der flächenbezogenen Permeationsraten (P_A) erfolgt allgemein nach folgender Gleichung:

$$P_A = \frac{c_i * F}{A}$$

Wobei mit c_i die Konzentration der Testsubstanz zum Zeitpunkt i , mit F die Flussrate des Sammelmediums (hier Helium: 20 ml/min) und mit A die benetzte Fläche angegeben wird.

Da bei der Injektion der Standards auf die Materialoberfläche lediglich ein Tropfen der Chemikalie (Lösung mit 1 g/l) aufgebracht wurde und ein großer Teil dieser zudem verdampfen kann, kann die benetzte Fläche nicht hinreichend genau bestimmt werden. Daher kann auch die Bestimmung der in der Literatur

üblichen, flächenbezogenen Permeationsrate ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) nicht berechnet werden.

Um dennoch abschätzen zu können wieviel der Testsubstanz das Material durchdringt wurde auf den Flächenbezug verzichtet wodurch sich die Berechnung der Permeationsrate auf $P_A = c_i \cdot F$ reduziert.

Eine semiquantitative Angabe der Permeationsraten ist in der folgenden Tabelle 39 angegeben.

Tabelle 39: Übersicht der Permeationsraten durch verschiedene Einmalhandschuhe

	Permeationsraten (pg/s)		
	Latex	Vinyl	Nitril
Me_2Hg	>>	>>	4
Me_4Sn	0,7	2,5	x)
Me_3GeCl	0,7	2,4	x)
Me_2AsI	5	3, 6	x)
Me_3Bi	7	0,3	1

>>) Permeationsrate extrem hoch, konnte aufgrund des starken Anstiegs nicht bestimmt werden

x) keine Permeationsraten bestimmbar

Da die Permeationskurven zudem einen exponentiellen Verlauf zeigen (am besten sichtbar in Abbildung 60, Seite 157) ist eine genauere Bestimmung der Permeationsraten ohne die Zeitabhängigkeit zu berücksichtigen nicht möglich.

Auch an anderer Stelle, wie z.B. in den zuvor beschriebenen Fermentern zur Biogaserzeugung, in denen metall(oid)organische Verbindungen gebildet werden (vgl. spezieller Teil, Kapitel 1, Seite 63), werden Kunststofffolien verwendet. Allerdings finden in diesen Fällen meist Folien aus Polyethylen, Polypropylen oder Polyvinylchlorid Anwendung. Inwieweit diese Planen eine Barriere für diese

Verbindungsklasse darstellen, ist bisher nicht untersucht. Zwar sind diese Folien die dort zum Einsatz kommen wesentlich dicker als Einmalhandschuhe, allerdings ist auch ihre Verwendungsdauer wesentlich länger. Eine Abschätzung der Permeationsraten metall(oid)organische Verbindungen in diesen Anlagen / durch diese Folien ist kaum möglich. Auch hier würde sich die oben verwendete Messzelle für weitere Untersuchungen eignen.

3.7 Zusammenfassung

Für die zu Anfang durchgeführten Messungen von Me_2Hg mit Latexhandschuhen konnte eine Durchbruchzeit von 11 Sekunden für Me_2Hg durch diesen Handschuhtyp ermittelt werden. Dies zeigt eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur aufgeführten Werten von 15 Sekunden (Blayney, 2001). Auch die zusätzlich mittels des ^{13}C Signals ermittelte Durchbruchzeit für Methanol von 45 Sekunden zeigt eine gute Vergleichbarkeit mit den üblichen Verfahren (Durchbruchzeit: 50 Sekunden (Universität Freiburg, 2012)). So konnten mit der neu gestalteten Messzelle, unter Verwendung von wenigen Mikrolitern der verdünnten metall(oid)organischen Verbindungen, die Durchbruchzeiten verschiedener metall(oid)organischer Verbindungen bei unterschiedlichen Handschuhmaterialien bestimmt werden. Dabei sollte es allerdings weniger auf die sekundengenaue Bestimmung der Durchbruchzeit bzw. der Permeationsraten ankommen. Vielmehr sollte eine schnelle, sichere und praktikable Möglichkeit geschaffen werden, um abzuschätzen, welches Material sich für die Handhabung einzelner metall(oid)organischer Verbindungen am besten eignet bzw. welche Materialien keinesfalls genutzt werden sollten. Latex- und Vinylhandschuhe boten kaum Schutz gegen diese Verbindungsklasse. Auch Nitrilhandschuhe waren nur sehr sehr eingeschränkt tauglich. Wirklichen Schutz gegen alle getesteten Substanzen boten nur die mehrlagigen, aber recht starren und schlecht sitzenden Handschuhe. Die Einführung einer zusätzlichen Klasse für Metallorganik in

die Liste der Prüfchemikalien (Tabelle 33, Seite 139) wäre wünschenswert, ist aber wohl kaum möglich. Allein die Festlegung der entsprechend zu verwenden Prüfchemikalie würde schwierig, da die einzelnen Verbindungen (z.B. Me_2Hg und Me_4Sn) extrem unterschiedliche Durchbruchzeiten zeigen.

Ein weiterer Vorteil der hier vorgestellten Messzelle ist die eingebaute Heizspirale unterhalb des Probenmaterials, mit der der Forderung nach paxisnahen und realistischen Bedingungen der Handschuh-Innentemperatur ($\sim 33^\circ\text{C}$) Rechnung getragen wird (Polanz *et al.*, 2003). Am Markt sind mittlerweile Geräte vorhanden, die ebenfalls eine Temperaturregelung besitzen (z.B. Handschuhtester Qu-mat®- Q401-HR der Firma LABC Labortechnik, Hennef) oder aufgrund ihrer kompakten Bauform eine direkte „Vor-Ort“-Messung ermöglichen (Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, 2010). Allerdings sind diese meist mit einem Photoionisations- oder Flammenionisationsdetektor ausgestattet. Eine Kopplung mit einem ICP-MS, wie hier zur Bestimmung von Metall(oid)en ist dort jedoch nicht berücksichtigt.

Auch an anderer Stelle, wie etwa in Biogasanlagen (vgl. spezieller Teil, Kapitel 1, Seite 63), werden Kunststofffolien verwendet werden, die von metall(oid)organischen Verbindungen durchdrungen werden könnten. Inwieweit diese Planen eine Barriere für diese Verbindungsklasse darstellen, ist bisher nicht untersucht. Die Fähigkeit der metall(oid)organischen Verbindungen Barrieren, wie etwa Membranen oder die Haut, leicht zu durchdringen, kann man sich zu Nutze machen und so die toxische Wirkung der leichtflüchtigen Verbindungen zu untersuchen. Der entsprechende Versuchsaufbau wird im folgenden Kapitel 4.1 beschrieben. Dazu wurden Zellen auf eine Membran aufgebracht und gegen flüchtige metall(oid)organische Verbindungen exponiert.

4. Toxikologische Untersuchungen

4.1 Zytotoxizität leichtflüchtiger metall(oid)organischer Verbindungen

4.1.1 Einleitung

Wie bereits im allgemeinen Teil (Kapitel 4, Seite 50) beschrieben, ist die Toxizität der anorganischen Formen etwa von Arsen oder Quecksilber meist sehr gut dokumentiert. Einige von ihnen werden sogar als relativ wenig giftig eingestuft (z.B. Zinn oder Bismut). Metall(oid)organische Verbindungen können hingegen hoch toxisch sein (siehe Dimethylquecksilber). Wie schnell gerade diese leichtflüchtigen, fettlöslichen, metall(oid)organischen Verbindungen Barrieren oder auch die Haut durchdringen können wurde bereits im vorangegangenen Kapitel mittels des entwickelten Handschuh testers (spezieller Teil, Kapitel 3, Seite 137) aufgezeigt.

Auch eine direkte Bildung und Einwirkung dieser Verbindungen im / auf den Menschen wurde bereits im allgemeinen Teil diskutiert (vgl. Kapitel 2.1 bis 2.5). Direkte toxikologische Tests mit diesen leichtflüchtigen metall(oid)organischen Verbindungen sind aufgrund ihrer Stabilität und oft schlechten Löslichkeit im Zellmedium äußerst problematisch. Bei der Exposition von Zellen gegen leichtflüchtige (metall(oid)organische) Verbindungen tritt oft bereits ein Großteil dieser Verbindungen aus der Lösung aus, bevor die Zellmembran passiert wird (Ehrenstein *et al.*, 2002) bzw. sind die Verbindungen erst gar nicht im Nährmedium löslich. Daher benötigen die toxikologischen Tests der leichtflüchtigen metall(oid)organischen Verbindungen im Vergleich zu toxikologischen Tests von nicht flüchtigen, wasserlöslichen Verbindungen ein komplett anderes experimentelles Design.

Für die folgenden Toxizitätstest wurde daher ein neues Expositionssystem entwickelt, mit dem sowohl zyto- als auch genotoxische Effekte von volatilen metall(oid)organischen Verbindungen wie Trimethylbismut (Me_3Bi),

Dimethylarsiniodid (Me_2AsI), Trimethylarsin (Me_3As), Tetramethylzinn (Me_4Sn), Dimethylquecksilber (Me_2Hg) und anderen vergleichbaren Verbindungen durchgeführt werden können.

Eigene Publikation:



(Dopp et al., 2011)

Während die Expositionsversuche zur Zytotoxikologie am Institut für Umweltanalytik der Universität Duisburg-Essen durchgeführt wurden, erfolgten sowohl die Untersuchungen zur Genotoxizität als auch die Kultivierung der Zellen im Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin am Universitätsklinikum Essen; Arbeitsgruppe Prof. E. Dopp. Ein Großteil dieser Arbeiten wurde bereits im „Journal of Toxicology“ publiziert (Dopp et al., 2011).

4.1.2 Material und Methoden

Für die durchgeführte Studie wurden drei verschiedene Zelllinien ausgewählt (Kapitel 4.1.2.1). Diese Zellen wurden zunächst kultiviert und zur Exposition auf Membranen (ThinCerts) aufgebracht, welche dann im Expositionssystem (Kapitel 4.1.2.3, Seite 169) den metall(oid)organischen Verbindungen ausgesetzt werden konnten.

4.1.2.1 Zellkultur

Für die durchgeführten Arbeiten wurden neben CHO-9 Zellen (engl. Chinese Hamster Ovary) als etabliertes Zellsystem für Toxizitätstests auch methylierende Hepatozyten (HepG2) sowie humane Darmkrebszellen (CaCo) verwendet,

welche auch in vorangegangenen Studien zur zellulären Aufnahme (Dopp *et al.*, 2004) und Toxizitätsbestimmung von nichtflüchtigen organischen und anorganischen Metall(oid)en verwendet wurden (Dopp *et al.*, 2005). Die genaue Bezeichnung der Zellen und ihre Herkunft sind in der folgenden (Tabelle 40) angegeben.

Tabelle 40: Zusammensetzung der Nährmedien für CaCo, CHO bzw. HepG2-Zellen.

CACO-2	Zusammensetzung des Nährmediums	Bezugsquelle
		ATCC, 169
Zell-Linien	Minimal Essential Medium (75%)	c.c.Pro, Oberdola
eines Dick-	(MEM, siehe Anhang)	
darm-	fetales Kälberserum (20 %)	c.c.Pro, Oberdola
Karzinoms	NEAA (5 %, 0,1mM)	c.c.Pro, Oberdola
(Human Colon	(nicht essentielle Aminosäuren)	
Cells)	Gentamycin (0,5 %)	c.c.Pro, Oberdola
	L-Glutamin (1 %)	Sigma, Oberhaching
HepG2	Zusammensetzung des Nährmediums	Bezugsquelle
		ATTC, HB 8065
Hepatozyten	Minimal Essential Medium mit	
(Human He-	Earle's BBS und Natriumbicarbonat	c.c.Pro, Oberdola
patoma Cells)	fetales Kälberserum (10 %)	Gibco
	NEAA (0,1 mM)	c.c.Pro, Oberdola
	(nicht essentielle Aminosäuren)	
	Natriumpyruvat (1 %)	c.c.Pro, Oberdola
	Penicillin / Streptomycin	
	(100 IU/ml)	c.c.Pro, Oberdola
CHO	Zusammensetzung des Nährmediums	Bezugsquelle
		ECACC 85050302
Ovarien des	Ham's F12 Medium	c.c.Pro, Oberdola
chinesischen	fetales Kälberserum (10 %)	c.c.Pro, Oberdola
Hamsters	Penicillin / Streptomycin	c.c.Pro, Oberdola
(Chinese Hams-	(100 IU/ml)	
ter Ovary)		

Sowohl HepG2 als auch CaCo-2 und CHO Zellen wurden unter typischen Zellkulturbedingungen (37 °C, 5% CO₂), kultiviert. Das jeweilige Kultur- / Nährmedium

(Zusammensetzung siehe Tabelle 40) wurde alle zwei bis drei Tage ausgetauscht²⁰.

Durch Zugabe von Antibiotika (hier Penicillin / Streptomycin / Gentamycin) wurde das Auftreten von Kontaminationen deutlich reduziert (Schmitz, 2007).

Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit einer Trypsin / EDTA Lösung (0,25% / 0,1%) inkubiert. Hierbei dient das EDTA zur Komplexierung des Ca^{2+} , welches ein wichtiger Bestandteil der Zell-Zell-Verbindungen ist. Das Trypsin ist ein Enzym (eine Protease) und spaltet die extrazellulären Membranproteine (Doenecke *et al.*, 2005). Die Kombination aus Trypsin und EDTA verkürzt die Inkubationsdauer bei der Zellablösung (Schmitz, 2007) und dient somit dem Schutz der Zellen.

Zur Exposition wurden 2×10^6 Zellen auf die Membran des Zellkultur-Einsatzes (ThinCert®, 0,4 μm , transparent, Greiner bio-one, Frickenhausen) aufgegeben. Die ThinCert® Zellkultur Einsätze sind aus einem transparenten Polystyrol-Gehäuse mit Böden aus Polyethylenterephthalat (PET) Kapillarporenmembranen gefertigt. Beide Materialien sind USP Class VI zertifiziert und absolut zellverträglich. Nach der Aufgabe der Zellen wurden diese mit 3 ml des der Zellart entsprechenden Mediums versetzt für 24 Stunden inkubiert.

4.1.2.2 Reagenzien

Falls nicht anderes angegeben, wurden nur Reagenzien von anerkannter Analysenqualität (analytical Grade) verwendet. Außer Dimethylarsiniodid (Me_2AsI), welches am Institut für Umweltanalytik synthetisiert wurde, erfolgte der Bezug der Chemikalien aus folgenden Quellen: Dimethylquecksilber (Me_2Hg , 98%) und Tetramethylzinn (Me_4Sn , 98%) stammten von Strem (Kehl, Deutschland), Trime-

²⁰ Vielen Dank an dieser Stelle an Frau G. Zimmer und U. Zimmermann vom Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin am Universitätsklinikum Essen (Arbeitsgruppe Prof. E. Dopp) für die freundliche Unterstützung bei der Kultivierung und Exposition der Zellen.

thylarsin (Me_3As) wurde von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Trimethylbismut (Me_3Bi) wurde von Vezerf (Idar-Oberstein, Deutschland) synthetisiert.

Synthese von Dimethylarsiniodid $((\text{CH}_3)_2\text{AsI})$:

Die Synthese des Dimethylarsiniodids $((\text{CH}_3)_2\text{AsI})$ erfolgte nach der Methode, die bereits von Styblo *et al.* beschrieben wurde (Styblo *et al.*, 1997). Dazu wurden zunächst 120 ml einer wässrigen Lösung von Dimethylarsinsäure (1 mol/l) mit Kaliumiodid und 7 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Zur Herstellung des in dieser Synthese notwendigen Schwefeldioxids (SO_2) wurden in einem 1 l Schlenkkolben 1,1 mol Na_2SO_3 vorgelegt und dieses mittels eines Tropftrichters langsam mit 500 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Die Reduktion zur trivalenten Arsenverbindung erfolgte durch Einleiten des SO_2 über einen Zeitraum von 4 Stunden in die Reaktionslösung. Zur Abtrennung und Aufreinigung des entstandenen Dimethylarseniodids (gelbe, ölige Flüssigkeit, Siedepunkt 155°C) wurde das Reaktionsprodukt mehrfach fraktioniert destilliert. Zur Identifikation des Dimethylarsiniodids wurde eine ^1H -NMR sowie eine GC-MS Analyse durchgeführt (Abbildung 62).

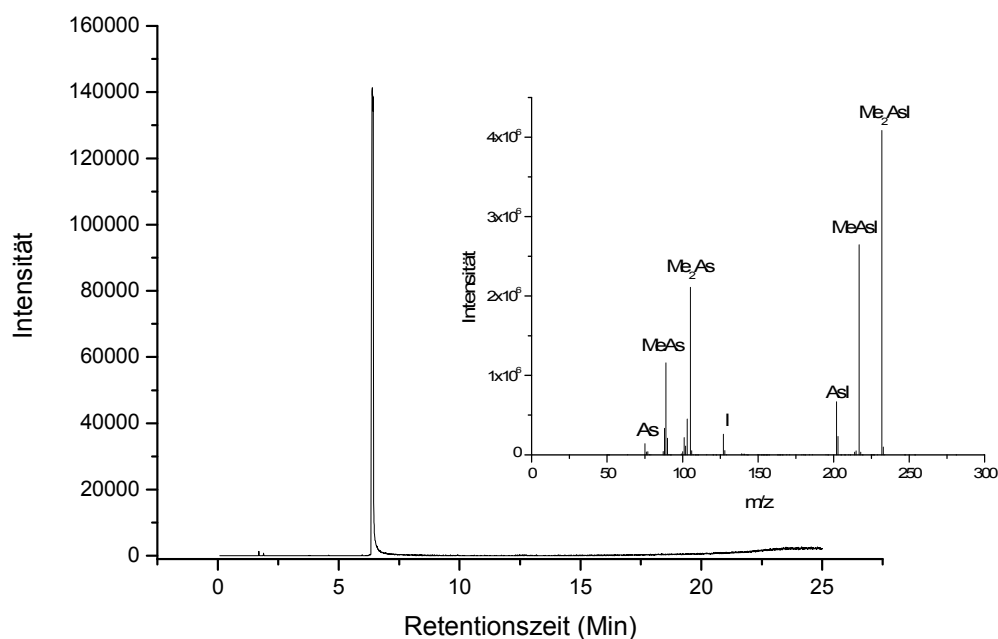


Abbildung 62: GC/MS – Analyse mit Chromatogramm und Massenspektrum des synthetisierten DMA(III) nach mehrfacher, fraktionierter Destillation (gelbe, ölige Flüssigkeit, Siedepunkt 155 °C). Retentionszeit: 6,41 Minuten.

Die Siedepunkte aller getesteten Verbindungen sind in Tabelle 41 aufgeführt.

Tabelle 41: Siedepunkte der auf Toxizität getesteten, leichtflüchtigen metall(oid)organischen Verbindungen

Verbindung	Formel	Siedepunkt	Referenz
Tetramethylzin	Me ₄ Sn	78°C	(Hoepfner et al., 1964)
Dimethylarseniodid	Me ₂ AsI	155-160°C	(Lee et al., 1923)
Trimethylarsin	Me ₃ As	51-53°C	(Dyke and Jones, 1930)
Trimethylbismut	Me ₃ Bi	107°C	(Bamford et al., 1946)
Dimethylquecksilber	Me ₂ Hg	92°C	(Wilde, 1949)

4.1.2.3 Expositionsgefäß / Exposition

Zur Exposition der auf der Membran des Zellkultur-Einsatzes (ThinCert) aufgetragenen Zellen wurden diese zunächst in einen Halter / Ständer eingesetzt, um später eine freie Exposition durch die Membran zu ermöglichen (Abbildung 63, links). Zur eigentlichen Exposition wurden die Ständer incl. Membran / ThinCert in einen 1000 ml Glasbehälter, welcher mit einem Teflondeckel verschlossen werden konnte, gestellt. Zum Spülen mit Inertgas (Argon) ist das Expositionsgefäß an den gegenüberliegenden Seiten mit jeweils einem Gashahn ausgestattet (Abbildung 63, rechts). Zum Einbringen der Metall(oid)-Standards ist das Gefäß am unteren Ende zusätzlich mit einem Septum (Schraubkappe) ausgestattet. Nach der Installation der Zellen im Expositionsgefäß wurde dieses verschlossen und für mindestens 3 Minuten mit Argon gespült um sowohl Sauerstoff als auch



Abbildung 63: Zellkultur-Einsatz (ThinCert) auf Halter / Ständer (links). Expositionsgefäß mit Einsatz / Halterung für ThinCert (rechts).

möglichst viel Feuchtigkeit auszuschließen, da im besonderen Me_3Bi extrem luft- und feuchtigkeitsempfindlich ist. Anschließend wurden verschiedene Mengen jeweils einer Metall(oid)spezies durch das Septum injiziert. Während der Expositionszeit von einer Stunde wurden die Behälter bei 37°C im Inkubator gelagert (Abbildung 64).



Abbildung 64: Modifizierter Glasbehälter zur Exposition der Zellen gegen leicht flüchtige metall(oid)organische Spezies. Die Zellen wachsen dazu auf permeablen Membranen (ThinCerts®).

Die Expositionszeit von einer Stunde wurde aufgrund vorher durchgeführter Versuche zur Toxizität der Verbindungen bei vorgegebener, geringer Konzentration ausgewählt. Dabei zeigte sich, dass mit längeren Expositionszeiten die toxische Wirkung so stark ist, dass bereits bei den geringsten Konzentrationen keine Zellen mehr überlebten, oder diese so stark geschädigt waren, dass die in diesen Versuchen zusätzlich durchgeführten genotoxischen Experimente (welche hier nicht aufgeführt werden sollen, da sie nicht Teil dieser Arbeit sind) nicht auszuwerten waren.

Die Expositions-kammer bzw. die Expositionsversuche sind so ausgelegt, dass die leichtflüchtigen metall(oid)organischen Verbindungen durch die Membran und nicht durch Lösen im Nährmedium an die Zellen gelangen. Um diesen Expositionspfad zu überprüfen und eine Exposition über die flüssige Phase auszuschließen wurden ebenfalls Expositionsversuche bei von unten abgedeckter Membran durchgeführt, so dass eventuell über das Nährmedium an die Zellen transportierte Testsubstanzen und deren toxische Wirkung festgestellt werden konnten.

Nach der Exposition wurden die Zellen mittels Trypsin (0,05%) von der Membran gelöst und so für den Trypanblau-Test sowie zur Bestimmung der Genotoxizität vorbereitet. Für alle Konzentrationen und alle Zellarten wurden die Versuche jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt. Als negative Kontrolle wurde jeweils eine nicht exponierte Probe für je eine Stunde inkubiert.

4.1.2.4 Trypanblau-Test

Bei Trypanblau (engl. Trypan Blue) handelt es sich um einen Diazofarbstoff, der von lebenden Zellen nicht, wohl aber von abgestorbenen Zellen aufgenommen wird. Diese abgestorbenen Zellen werden durch den Farbstoff dunkelblau angefärbt. Aufgrund der Aufnahme des Farbstoffes kann man den Zustand der Zellmembran erkennen und so indirekt auf die Vitalität der Zellen schließen. Trypanblau kann sich als Anion mit vier Sulfonatgruppen leicht an Proteine binden. Wegen der Zytotoxizität von Trypanblau muss die Auswertung unmittelbar nach der Zugabe des Farbstoffes erfolgen.

Direkt nach der Exposition der Zellen wurden diese also zunächst mittels Trypsin von der Membran gelöst und die Zellsuspension mit Trypanblau (0,4%) versetzt. Die Auszählung der blau angefärbten Zellen erfolgte mittels einer Neubauerzählkammer. Diese besteht aus neun großen Quadraten, welche jeweils eine Fläche von 1 mm² besitzen. Da die Höhe zwischen dem Deckglas und dem Objektträger genau 0,1 mm beträgt ergibt sich so ein Volumen von 0,1 µL. Ausgezählt wurden jeweils drei Quadrate, aus denen der Mittelwert errechnet wurde. Bei hohen Zellzahlen musste mit dem Verdünnungsfaktor der Zellsuspension multipliziert werden. Die Zellvitalität wird als prozentualer Wert der überlebenden Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen angegeben:

$$\text{Zellvitalität (\%)} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} * 100$$

Alle Tests wurden nach Möglichkeit dreifach durchgeführt.

4.1.3 Ergebnisse und Diskussion

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden die einzelnen Zelllinien bei variabler Konzentration dreifach gegen die Metall(oid)spezies Trimethylbismut (Me_3Bi), Dimethylarsiniiodid (Me_2AsI), Trimethylarsin (Me_3As), Tetramethylzinn (Me_4Sn) und Dimethylquecksilber (Me_2Hg) exponiert. Wie Abbildung 65 am Beispiel der

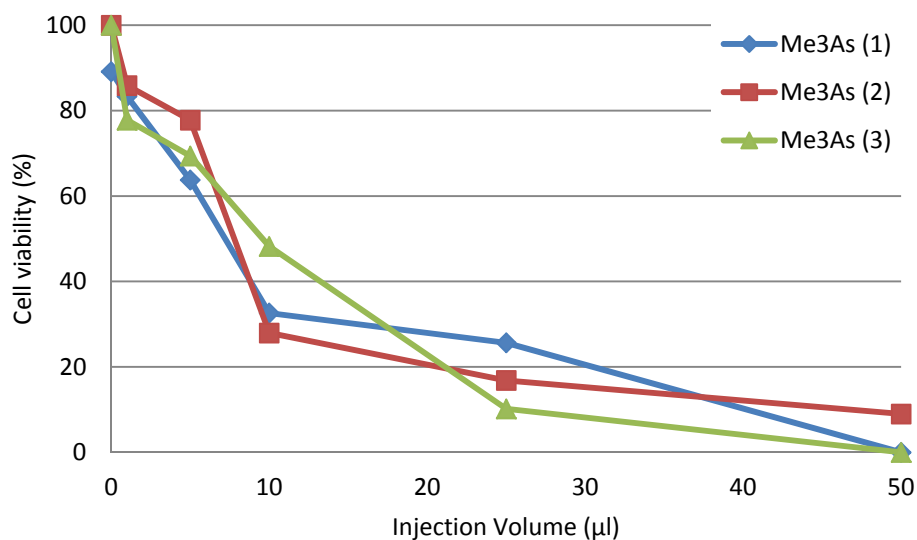


Abbildung 65: Dreifachbestimmung der Vitalität von HepG2-Zellen mittels Trypanblau nach Exposition der Zellen gegen verschiedene Injektionsvolumina Me_3As .

Vitalität von HepG2-Zellen nach Exposition der Zellen gegen Me_3As zeigt, waren die mittels Trypanblau-Test ermittelten Zellvitalitäten für ein biologisches System sehr gut reproduzierbar.

Eine nahezu 100%ige Vitalität der Zellen in den jeweiligen Negativkontrollen (Injektionsvolumen = 0 µl; Abbildung 65) zeigt, dass keine Querkontamination durch die unterschiedlichen Injektionsvolumina erfolgte, die sich gleichzeitig im Inkubator befanden, die einzelnen Expositionsgefäße dicht verschlossen waren und sich gegenseitig nicht beeinflussten.

Durch Abdecken der Membranen bei gleichzeitiger Exposition mit hoher Konzentration, bei der ohne Abdeckung alle Zellen abgestorben waren, konnte gezeigt werden, dass die Exposition tatsächlich durch die Membran und nicht über die Mediumphase / Flüssigphase erfolgt (Abbildung 66). Bei abgedeckter Membran betrug die Vitalität der Zellen nach der Exposition im Vergleich mit der entsprechenden Negativkontrolle 100 %.

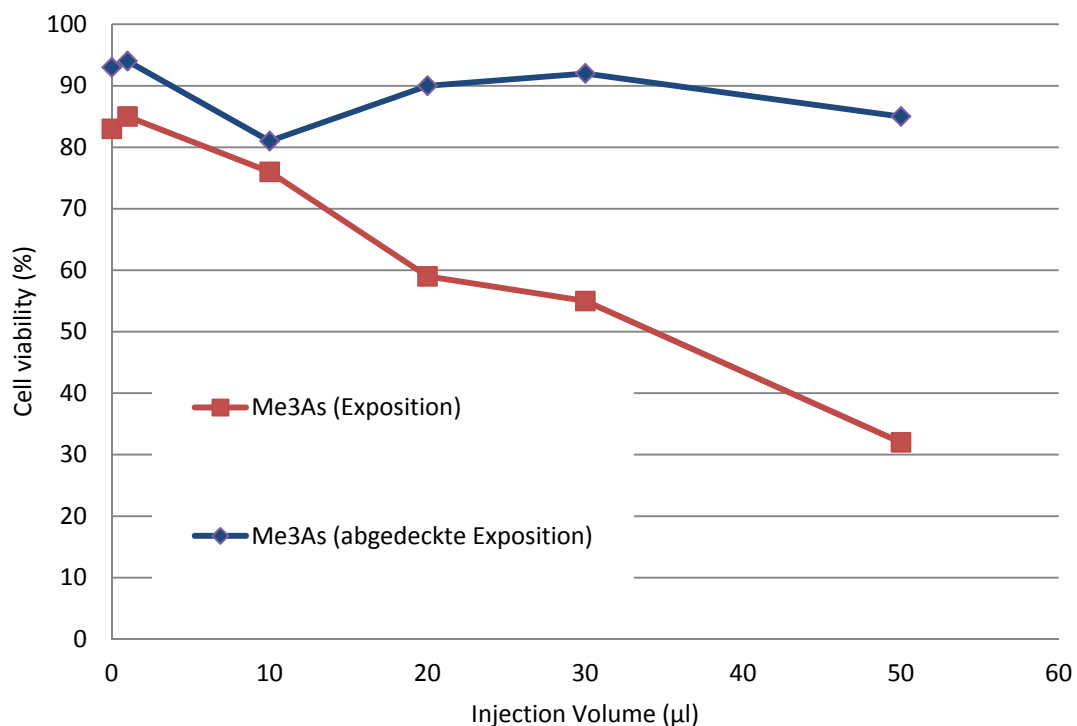


Abbildung 66: Zellvitalität bei Exposition gegen Me₃As im Vergleich zur Exposition bei abgedeckter Membran.

Wie zu erwarten, zeigte Me₂Hg im Vergleich zu allen weiteren getesteten Spezies die größten zytotoxischen Effekte. Bereits die geringste applizierbare Konzentration von 11 µmol/l bewirkte einen mehr als 50%igen Zelltod der CHO-9-Zellen (Abbildung 67)²¹.

²¹ Diese, sowie die folgenden vier Abbildungen wurden der bereits publizierten, eigenen Originalliteratur entnommen: Dopp E, von Recklinghausen U, Hippler J, Diaz-Bone RA, Richard J, Zimmermann U, Gerhards M, Rettenmeier AW, Hirner, AV, Toxicity of volatile methylated species of bismuth, arsenic, tin and mercury in mammalian cells in vitro. Journal of Toxicology (Special Issue: Toxicity of Organometal(loids)) 2011 (Article ID 503576) 7 Seiten.

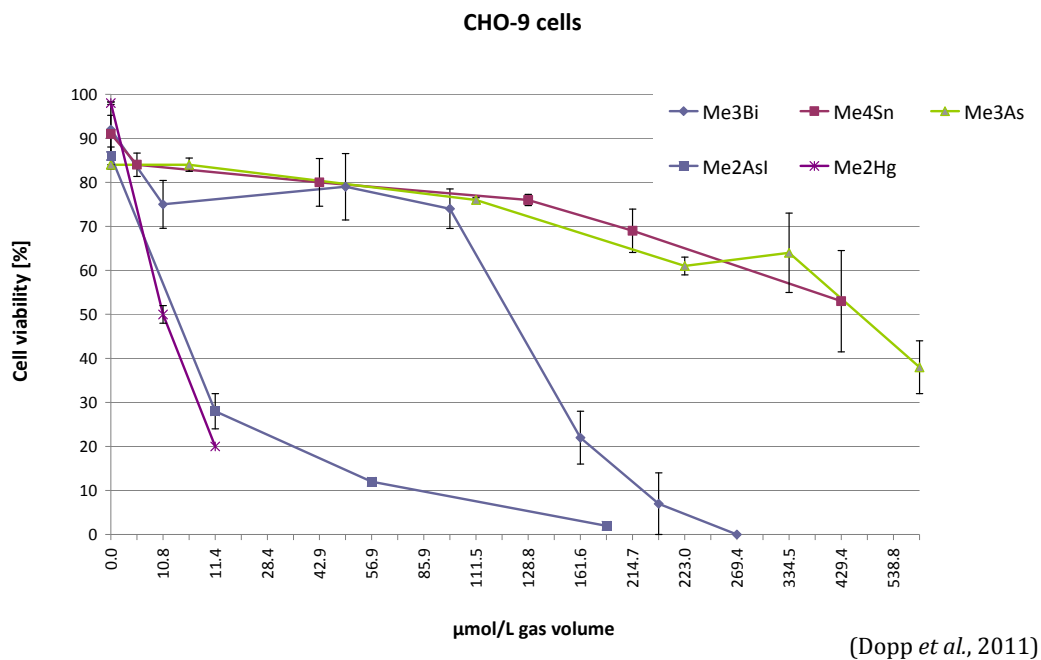


Abbildung 67: Vergleich der Zytotoxizität der fünf verschiedenen Metall(oid)verbindungen (Me₃Bi, Me₄Sn, Me₃As, Me₂AsI, Me₂Hg) in CHO-9-Zellen (Zweifachbestimmung).

Auf die Verwendung höherer Konzentrationen (gerade im Hinblick auf die zur Bestimmung der Genotoxizität durchzuführenden Tests) wurde aus Sicherheitsgründen verzichtet. Daher endet die Kurve des Me₂Hg in der oben genannten Abbildung bereits bei geringerer Konzentration im Gasvolumen als die der anderen Metall(oid)spezies. Lediglich Me₂AsI zeigte eine ähnliche toxische Wirkung auf CHO-Zellen wie Me₂Hg. Für alle anderen Metall(oid)verbindungen wurden wesentlich höhere LC₅₀ Werte ermittelt.

Aufgrund der extrem hohen Toxizität konnten nicht alle Zelllinien gegen Me₂Hg exponiert werden. Lediglich für CaCo-Zellen konnte mittels einer Einzelbestimmung ein LC₅₀-Wert von 40 μmol/l ermittelt werden, was auf eine höhere Resistenz dieser Zellen im Vergleich zu CHO-Zellen hinweist. Alle anderen leichtflüchtigen metall(oid)organischen Verbindungen wurden gegen alle oben genannten Zelllinien getestet und werden im Folgenden dargestellt. Besonders auffällig waren dabei die Ergebnisse des Me₂AsI.

Me₂AsI zeigte eine hohe Zytotoxizität sowohl gegen HepG2 als auch, etwas abgeschwächt gegen CHO-Zellen, welche durchaus mit der des Me₂Hg vergleichbar ist (Abbildung 67). Bei CaCo-Zellen zeigte sich allerdings eine wesentlich geringere Toxizität (Abbildung 68).

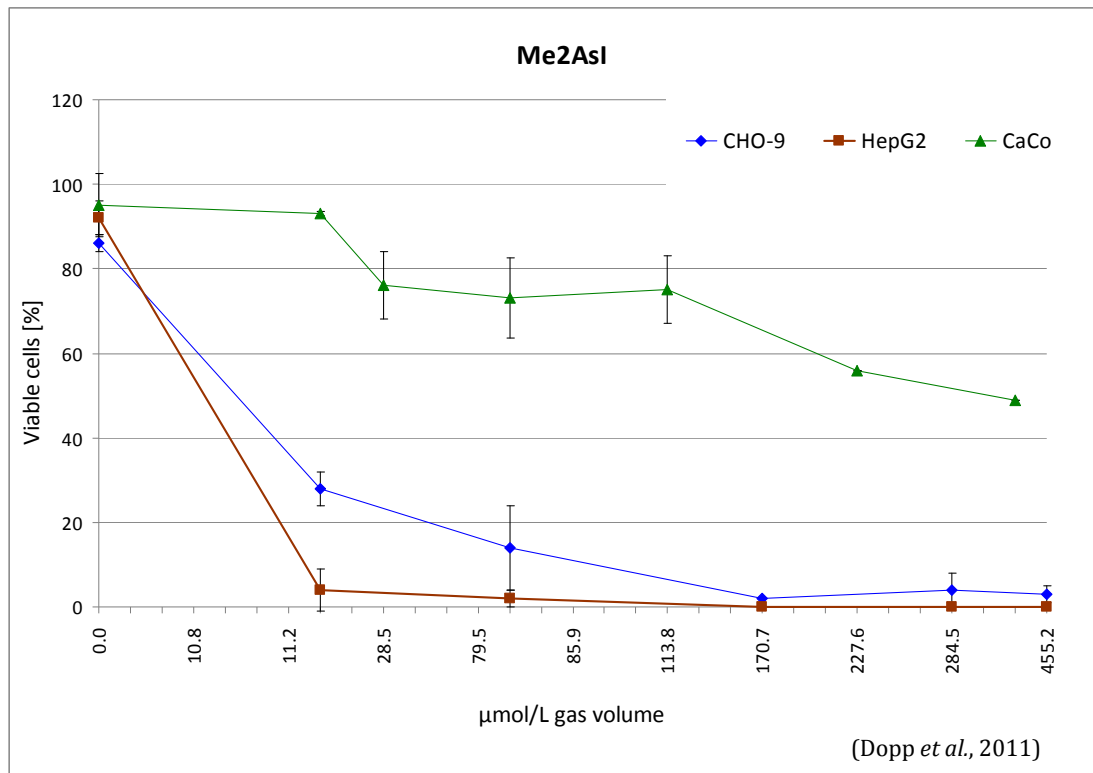


Abbildung 68: Zytotoxizität von Dimethylarseniodid (Me₂AsI) in CHO-9, HepG2 und CaCo-Zellen (Dreifachbestimmung).

Die Effekte, gerade bei CHO und CaCo-Zellen, sind vergleichbar mit denen der nichtflüchtigen Dimethylarsinigen Säure (DMA III / Me₂AsOH), welche auch in der Literatur als toxischste Arsenspezies beschrieben wird (Dopp *et al.*, 2010). So liegen auch die LC₅₀-Werte in der Gasphase, verglichen mit denen der flüssigen Phase sehr nahe beieinander: LC₅₀(Me₂AsI, CHO) = 11,2 µmol/l; LC₅₀(Me₂AsOH, CHO) = 10 µmol/l (Dopp *et al.*, 2004).

Auch Trimethylarsen zeigte in allen drei Zelllinien eine zytotoxische Wirkung. Hier erwiesen sich, wie schon bei der Exposition gegen Me₂AsI, ebenfalls die HepG2 als empfindlichste Zellart, gefolgt von CaCo und CHO-Zellen (Abbildung

69). Verglichen mit Me_2AsI wirkt Me_3As allerdings wesentlich weniger zytotoxisch.

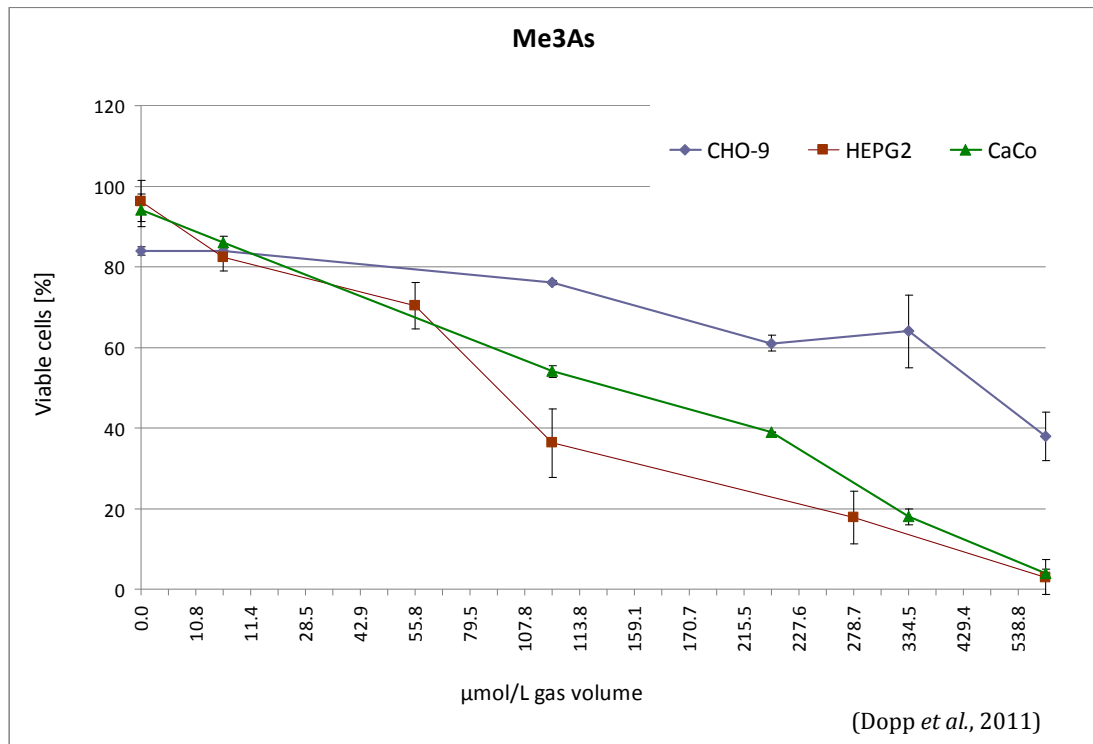


Abbildung 69: Zytotoxizität von Trimethylarsin (Me_3As) in CHO-9, HepG2 und CaCo Zellen (Dreifachbestimmung).

Während bei der Exposition von CHO und HepG2-Zellen gegen Me_2AsI bereits bei 11 $\mu\text{mol/l}$ mehr als die Hälfte der Zellen abgestorben waren, waren bei Exposition gegen Me_3As 86 (HepG2), 129 (CaCO) bzw. 450 $\mu\text{mol/l}$ (CHO) notwendig um den LC_{50} -Wert zu erreichen. Verglichen mit der trimethylierten, fünfwertigen Arsenspezies (Me_3AsO), setzt sich hier die wesentlich toxischere Wirkung der dreiwertigen Arsenspezies fort.

Im Gegensatz zu den Arsenspezies zeigte Me_3Bi auf alle drei getesteten Zelllinien eine rechte ähnliche zytotoxische Wirkung (Abbildung 70). Extreme Unterschiede zwischen den Zelllinien, wie etwa beim Me_2AsI , waren nicht feststellbar.

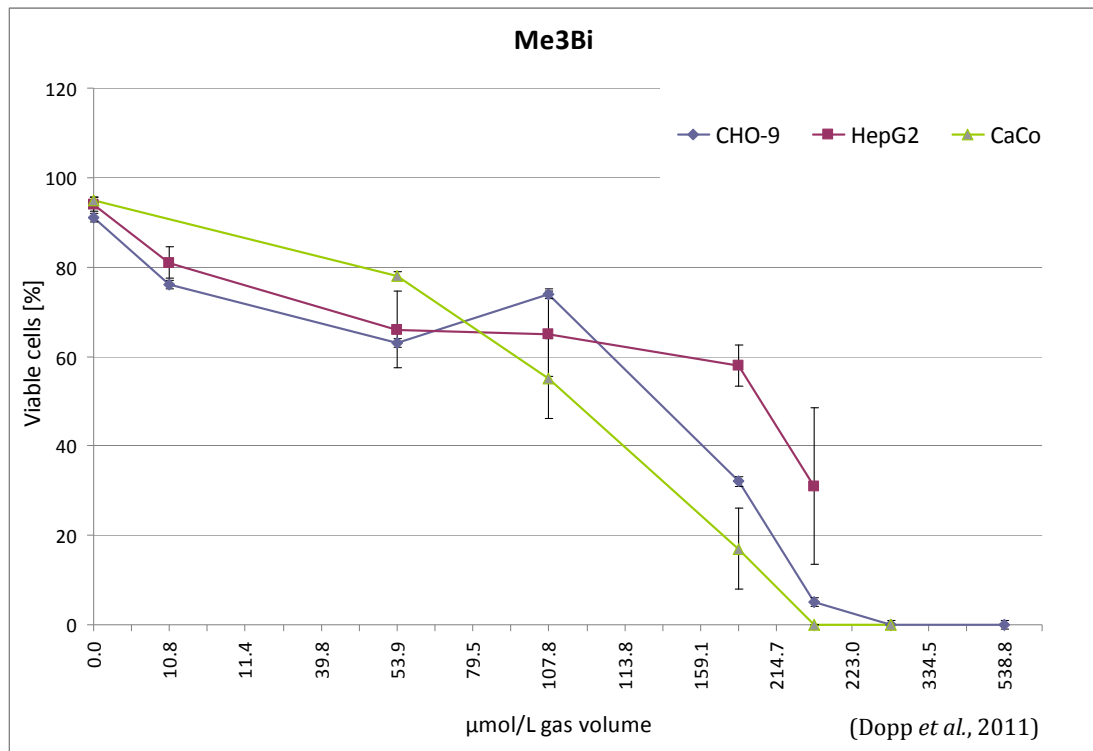


Abbildung 70: Zytotoxizität von Trimethylbismut (Me_3Bi) in CHO-9, HepG2 und CaCo Zellen (Dreifachbestimmung).

Tetramethylzinn zeigte von allen getesteten Verbindungen die schwächsten to-
 xikologischen Wirkungen. Lediglich in CaCo-Zellen konnte bei einer Exposition
 von mehr als $171\mu\text{mol/l}$ Me_4Sn ein 50%iger Zelltod (LC_{50}) induziert werden.
 Gerade bei HepG2-Zellen, welche sich am Empfindlichsten gegenüber Arsenspe-
 zies zeigten, konnte keine signifikante Vitalitätsänderung beobachtet werden
 (Abbildung 71).

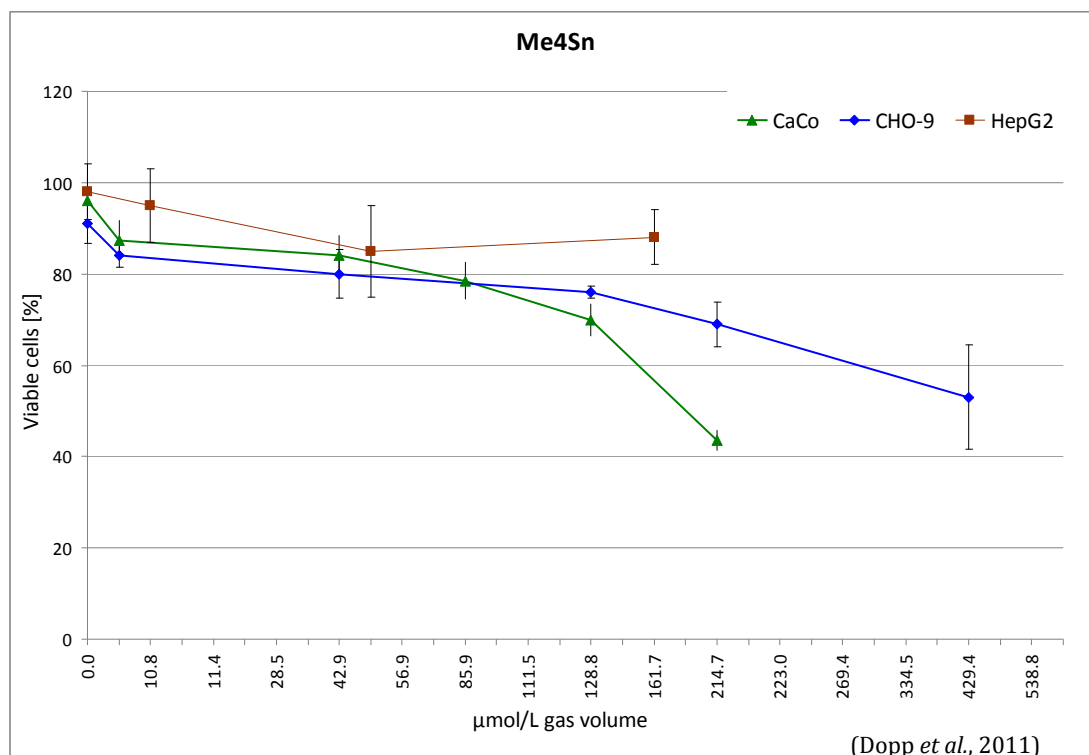


Abbildung 71: Zytotoxizität von Tetramethylzinn (Me₄Zn) in CHO-9, HepG2 und CaCo Zellen (Dreifachbestimmung).

Zur Übersicht sind in Tabelle 42 die aus den vorangegangenen Zytotoxizitätstest ermittelten LC₅₀-Konzentrationen zusammengefasst.

Tabelle 42: LC₅₀-Werte der untersuchten flüchtigen Metall(oid)spezies für unterschiedliche Zelllinien (Expositionszeit: 1 Stunde).

µmol/l _{gv}	CaCo	CHO-9	HepG2
Me ₄ Sn	171	n.ct.	n.ct.
Me ₂ AsI	335	11	11
Me ₃ As	129	450	86
Me ₃ Bi	110	128	194
Me ₂ Hg	40	11	n.t.

n.ct.: nicht zytotoxisch im getesteten Konzentrationsbereich, n.t.: nicht getestet

4.1.4 Zusammenfassung

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass Dimethylquecksilber, gefolgt von Dimethylarsiniodid, für alle drei getesteten Zelllinien (CHO-9, CaCo, Hep-G2) die höchste, Tetramethylzinn verglichen mit den anderen Spezies die geringste zytotoxische Wirkung aufweist. Stärker als erwartet war die toxische Wirkung vom jeweiligen Zelltyp abhängig, was mit unterschiedlichen Aufnahmeprozessen erklärt werden kann, wie sie auch für Arsenspezies nachgewiesen wurden (Dopp *et al.*, 2004). Die geringe Empfindlichkeit der CHO-Zellen gegenüber Me₂AsI lässt sich möglicherweise auf die in diesen Zellen vorhandenen multiresistenten Proteine (MRP2) zurückführen (Drobná *et al.*, 2010).

Auffallend ist auch der Unterschied in der zytotoxikologischen Wirkung zwischen Me₃As und Me₂AsI. Die dimethylierte Spezies wirkt hier auf CHO und HepG2-Zellen deutlich toxischer als die trimethylierte, was wiederum auf unterschiedliche Aufnahme und toxikologische Reaktionen hinweist. Wie zu Anfang beschrieben (allgemeiner Teil, Kapitel 2.1, Seite 17) galt Trimethylarsin lange als besonders giftig und wurde für viele Todesfälle Ende des 19. Jahrhunderts verantwortlich gemacht. Neuere Untersuchungen deuteten allerdings auf eine vergleichsweise geringe akute Toxizität hin (Cullen *et al.*, 2005). Auch die hier durchgeführten Arbeiten deuten auf eine, verglichen mit Dimethylquecksilber, aber auch dimethylierten Arsenverbindungen, wesentlich geringere Toxizität hin, was die o.g. Untersuchungen von Cullen *et al.* bestätigt.

Während anorganisches Bismut als weitgehend ungiftig gilt, konnten für methylierte Bismutspezies deutliche toxikologische Effekte beobachtet werden. Während für die monomethylierte Spezies (MeBi(III)) in der Literatur ein LC₅₀-Wert von 350 µmol/l_(lv) bei Exposition von HepG2-Zellen angegeben wird (von Recklinghausen *et al.*, 2008), konnte hier für die trimethylierte Verbindung (Me₃Bi) bei der Exposition der gleichen Zelllinie ein LC₅₀-Wert von nur 194 µmol/l_(gv) LC ermittelt werden. Dies bestätigt die Vermutung, dass auch methylierte Bismutverbindungen toxischer sind als die als weitgehend harmlos eingestuften anorganischen Verbindungen. Im Vergleich zu den anderen hier

getesteten Spezies wurde für Me_4Sn die geringste Zytotoxizität festgestellt. Weder auf CHO, noch auf HepG2-Zellen wirkte diese Substanz im Bereich der getesteten Konzentration zytotoxisch. Generell konnte gezeigt werden, dass alle leichtflüchtigen metall(oid)organischen Verbindungen schon bei geringer Konzentration eine signifikante zytotoxische Wirkung gegen humane Zellen zeigen. Allerdings ist dies abhängig von dem jeweiligen Metall(oid) sowie des Zelltyps.

Wie im allgemeinen Teil (Kapitel 4.2, Seite 53) bereits angemerkt wurden ebenfalls genotoxische Untersuchungen durchgeführt (Comet-Assay²²); es sei aber nochmals darauf hingewiesen, dass diese nicht Bestandteil dieser Arbeit sind und im Universitätsklinikum der Universität Duisburg-Essen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse finden sich sowohl, zusammen mit den Ergebnissen dieser hier bereits aufgeführten Arbeiten, in: „Dopp E *et al.*, Toxicity of volatile methylated species of bismuth, arsenic, tin and mercury in mammalian cells in vitro. Journal of Toxicology (Special Issue: Toxicity of Organometal(loids)) 2011 (Article ID 503576) 7 Seiten“ (Ein Reprint des gesamten Artikels befindet sich im Anhang), als auch im Buchkapitel „Early molecular changes in the genome of arsenic-exposed human urothelial cells depending on cellular uptake and biotransformation“ (Zdrenka *et al.*, 2010).

Für Me_2Hg zeigt sich das hohe Gefahrenpotential dieser Verbindung, wenn man bedenkt, wie schnell es Barrieren durchdringen kann (spezieller Teil, Kapitel 3, Seite 137) und wie hoch die toxikologische Wirkung dieser Verbindung auf die Zellen ist. Auch die Wirkung der Arsenspezies, insbesondere die des Me_2AsI und selbst die von Me_3As sind nicht zu unterschätzen. Hier hat sich gezeigt, dass diese im Fall des Me_2AsI durchaus mit denen des Dimethylquecksilbers vergleich-

²² Mittels des s.g. Comet-Assays lassen sich DNA-Doppel- und Einzelstrangbrüche feststellen und so genotoxische Effekte nachweisen. Das Prinzip des Comet-Assays beruht auf der Elektrophorese, wobei bruchstückhafte DNA innerhalb des Feldes wandert. Unter dem Mikroskop erscheinen die beschädigten Zellen, mit einem Schweif aus DNA Bruchstücken, der ihnen das Aussehen eines Kometen gibt.

bar sein können. Zieht man die in Kapitel 3.6.3 gemachten Beobachtungen der kurzen Durchbruchsraten hinzu, so zeigt sich auch hier ein hohes Gefahrenpotential, besonders an den Stellen in der Umwelt, an denen diese Verbindungen gebildet bzw. aufkonzentriert werden oder auch Membranen durchdringen und so auf den Menschen einwirken können, wie es unter Umständen auch in Biogasanlagen der Fall sein kann (spezieller Teil, Kapitel 1, Seite 63).

Für Arsen wird oft die auf unterschiedliche Aufnahme einzelner Spezies in die Zellen für deren toxikologische Wirkung verantwortlich gemacht. Allerdings ist es schwierig festzustellen, in welcher (methylierten) Form das Element aufgenommen wird, wie es in den Zellen vorliegt und es sich dort verhält. Für Monomethylarsen soll dieser Frage im folgenden Abschnitt weiterführend nachgegangen werden.

4.2 Wirkung von Monomethylarsen auf HepG2 und UROtsa

Viele Studien beschreiben MMA(III) als wichtigen Metaboliten im humanen Arsenzyklus. Die Methylierung des Arsens findet dabei hauptsächlich in der Leber unter Beteiligung von Methyldonoren wie S-Adenosylmethionin (SAM) und Gluthation (GSH) statt (Dopp, 2007). Obwohl ein Großteil des Arsens über den Urin als DMA(V) wieder ausgeschieden wird, akkumulieren die methylierten Spezies in der Leber, den Haaren und den Nieren (allgemeiner Teil, Abbildung 18, Seite 57). Zudem unterliegt möglicherweise auch das Arsen nach oraler Aufnahme dem s.g. „first-pass-effect“, wie es bei vielen anderen oral aufgenommenen Schadstoffen beobachtet werden kann. Oral aufgenommene Schadstoffe werden in diesem Fall durch die Darmschleimhaut resorbiert und von dort direkt zur Leber transportiert, wo sie entsprechend metabolisiert werden können (Forth *et al.*, 2009).

Eigene Publikation



Inside front cover of *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Issue 12, 2011.

(Hippler *et al.*, 2011)

Im Rahmen der vorangegangenen Arbeiten wurden bereits die analytischen Methoden zur intrazellulären Arsenspezifizierung nach Exposition der Zellen gegen MMA(III) erstellt und die Möglichkeit zur schnelleren und besser auflösenden Chromatographie geschaffen (Hippler, 2011). So konnte eine vielfältige Speziesumwandlung und Methylierung in Leberzellen (HepG2-Zellen) beobachtet werden (Hippler *et al.*, 2011). Es stellte sich heraus, dass die Methylierung zeitlich betrachtet kein kontinuierlich ablaufender Prozess ist. Zudem konnte erstmals MMMTA(V) sowie weitere, unbekannte (Thio?-) Arsenspezies in den Lysaten von HepG2-Zellen nachgewiesen werden. Basierend auf den durchgeführten

Expositionsreihen konnte ein neuer Reaktionspfad für die Biomethylierung von MMA(III) in HepG2-Zellen vorgeschlagen werden (allgemeiner Teil, Kapitel 4.2, Seite 53). Allerdings blieben dabei einige Fragen offen, die hier erneut aufgegrif-

fen und durch weitergeführte Arbeiten ergänzt werden sollen. Zum einen stellte sich die Frage, um welche unbekannten Arsenspezies es sich handelt und ob weitere Spezies, wie z.B. Arsenobetain, ebenfalls mit der vorhandenen Methode nachgewiesen werden können. Zum anderen blieb ungeklärt, wie viel Arsen überhaupt in die Zellen eindringt bzw. in der Zellmembran und anderen, nicht löslichen Zellbestandteilen vorhanden ist. Auch in welcher Form (Methylierungsgrad) es dort vorliegt blieb unklar. Zudem besteht die Frage, wieso und wo in der Zelle eine Oxidation stattfinden kann.

Zur Weiterführung dieser Arbeiten wurden Zellen gegen MMA(III) exponiert, aufgearbeitet und analytisch untersucht. Zellkultur, Exposition und Zelllyse sowie Verbrauchsmaterialien, Standards und insbesondere die analytischen Geräte und Methoden sind entweder in den vorangegangenen Kapiteln oder in Hippler (2011) eingehend beschrieben, sollen aber im Folgenden nochmals aufgeführt und wenn nötig erläutert werden.

4.2.1 Material und Methoden

Arsen-Standards

Die meisten der verwendeten Arsenspezies (Tabelle 43) sind als Reinsubstanz direkt erhältlich. Dimethylarseniodid musste, wie in Kapitel 4.1.2.2 (spezieller Teil, Seite 166) beschrieben, durch eine Laborsynthese hergestellt werden. Auch die Arsenthiospezies sind nicht kommerziell erhältlich und mussten daher ebenfalls synthetisiert werden.

Die flüssigen Standards der oben genannten Arsenspezies wurden wöchentlich in Reinstwasser als sogenannte „Stammlösungen“ mit einer Konzentration von 1 g/l angesetzt. Für Messzwecke wurde daraus ein Arsen-Multistandard mit einer Konzentration von 10 µg/l angesetzt. Alle Konzentrationsangaben beziehen

sich hier auf die Elementkonzentration (As) und nicht auf die Verbindung. Die frisch angesetzten Lösungen wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Tabelle 43: Verwendete Arsenstandards mit Bezugsquellen.

Substanz (Arsenspezies)		Hersteller
Natriumarsenite / As(III)	98 %	Fluka, Seelze
Natriumarsenate heptahydrat / As(V)	98 %	Fluka, Seelze
Methylarsindiodid / MMA(III)	98 %	Argus Chemicals, Vernio, Italien
Dimethylarsiniodid / DMA(III)	> 99 %	Eigene Synthese
Monomethylarsonsäure, - dinatriumsalz / MMA(V)	98 %	Argus Chemicals, Vernio, Italien
Dimethylarsinsäure; Kakodylsäure / DMA(V)	99,5 %	ABCR GmbH, Karlsruhe
Monomethylmonothioarsenat / MMMTA(V)	keine Angabe	Synthese durch O. Würfel ²³
Monothioarsenat / MTA(V)	keine Angabe	Überlassen von Prof. Dr. Planer- Friedrich ²⁴
Arsenobetain / As-Bet	98 %	Tri Chemical Laboratories Inc, Ya- manashi, Japan

DMA(III) ist nur als Reinsubstanz stabil und wird in wässriger Lösung schnell (innerhalb weniger Stunden) zu DMA(V) oxidiert. Daher wurde dieser Standard generell vor der jeweiligen Messung aus der Originalsubstanz neu angesetzt, falls dieser benötigt wurde, und findet sich daher nicht in allen Standards bzw. Chromatogrammen wieder. Für die Exposition der Zellen gegen MMA(III) wurde eine 500 µmol/l MMA(III)-Stammlösung in Reinstwasser hergestellt, portioniert und bei -20 °C gelagert.

²³ O. Würfel, Mikrobiologie I, Universität Duisburg-Essen, Essen

²⁴ Prof. Dr. Planer-Friedrich, Universität Bayreuth

Verwendete Zelllinien und Nährmedien

Für die durchgeführten Arbeiten wurden sowohl methylierende Hepatozyten (HepG2) als auch nicht methylierende Urothelzellen (UROtsa) ausgewählt. HepG2-Zellen wurde bereits in Kapitel 4.1.2 (spezieller Teil, Seite 164) beschrieben. Die genaue Bezeichnung der UROtsa sowie das entsprechende Nährmedium ist in Tabelle 44 angegeben.

Tabelle 44: Zusammensetzung der Nährmedien für UROtsa-Zellen.

UROtsa²⁵:	Nährmedium	Bezugsquelle
SV40-transformierte humane Urothelzellen	Minimal Essential Medium (MEM, siehe Anhang)	c.c.Pro, Oberdola
	fetales Kälberserum (10 %)	c.c.Pro, Oberdola
	Gentamycin (0,5 %)	c.c.Pro, Oberdola
	L-Glutamin (1 %)	Sigma, Oberhaching

Zellkultur

Sowohl UROtsa als auch HepG2 Zellen wurden unter typischen Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Das jeweilige Kultur- / Nährmedium wurde alle zwei bis drei Tage ausgetauscht. Zum Passagieren (Subkultivierung) der Zellen wurde eine Trypsin-EDTA Lösung 0,25 % / 0,1 % verwendet.

Expositionsmedien und Waschlösungen

Die zur Exposition der Zellen gegen MMA(III) verwendeten Lösungen waren entsprechend der in den Tabelle 40 (Seite 165) bzw. Tabelle 44 aufgeführten Nährmedien zusammengesetzt, enthielten aber zusätzlich die entsprechende

²⁵ freundlicherweise überlassen von M. Styblo, University of North Carolina, USA.

Konzentration der Arsenverbindung (5 µmol/l MMA(III)). Für die Exposition der Zellen gegen MMA(III) wurde eine 500 µmol/l MMA(III)-Stammlösung in Reinstwasser hergestellt, portioniert und bei -20°C gelagert. So gelagert ist der Standard für Wochen bis Monate stabil (Reichel, 2009).

Tabelle 45: Waschlösungen für UROtsa und HepG2-Zellen sowie weiterer Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung	Bezugsquelle
PBS	Phosphorgepufferte-Salzlösung (siehe Anhang)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Ampuwa	Reinstwasser	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
DMPS (2,3-bis(sulfanyl) propan-1-sulfonsäure)	0,1 mM in Ampuwa	Alfa Aesar, Karlsruhe
Trypsin / EDTA	0,5 % / 0,2 % in PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	c.c.Pro, Oberdola,

Exposition der Zellen

Zur Exposition wurden die Zellen in eine 150 cm² Zellkulturflasche eingesät, mit 30 ml Nährmedium versetzt und im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, bis sich ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hatte. Von den in der Zellkultur bis zur Konfluenz gewachsenen Zellen wurde für die Exposition das reine Nährmedium gegen das MMA(III)-haltige Nährmedium ausgetauscht. Die Exposition der Zellen erfolgt somit gegen 5 µmol/l MMA(III) bei 37°C mit 5% CO₂ für die jeweilige im experimentellen Teil angegebene Expositionszeit.

Aufreinigung der Zellen

In der späteren Analytik sollten die Arsenspezies der Zelllysate sowie die Arsenkonzentrationen in den Zellresten nachgewiesen werden. Um sicher zu stellen, dass sich zum Zeitpunkt der Lyse außerhalb der Zelle keine ungebundenen Arsenspezies mehr befinden, müssen die Zellen nach der Exposition gründlich gewaschen und später von den Zellresten getrennt werden (Abbildung 72). Im Anschluss an die Exposition wurde das Expositionsmedium aus den Zellkulturflaschen entnommen. Zum Waschen der Zellen wurden diese im ersten Schritt mit 10 ml PBS überschichtet, die Zellkulturflasche leicht geschwenkt und die PBS-Waschlösung wieder abgenommen. Als nächstes folgte ein Waschvorgang mit 10 ml Ampuwa, welcher möglichst schnell auszuführen war, um eine vorzeitige osmotische Lyse der Zellen zu verhindern. Als dritter Waschvorgang wurde eine DMPS Lösung verwendet, bevor erneut mit 10 ml PBS (0,1 mmol/l) gewaschen wurde. Ein Teil eines jeden Mediumüberstandes sowie jeder Waschlösung wurde zur späteren Messung per HPLC/ICP-MS in Kunststoff-Röhrchen überführt.



Abbildung 72:
Waschschrirte
zur Entfernung
der extrazellulären
Arsenspezies.

Zell-Lyse und Probenvorbereitung

Nach der Exposition und den Waschvorgängen wurden die Zellen mittels eines Cellscrapers (Schmitz, 2007) aus der Zellkulturflasche entfernt und in 0,5 mL-Precellys-Keramik-Kit-Röhrchen überführt. Zur Lyse wurden die Röhrchen in den Probenträger des Homogenisators (Precellys® 24 Homogenisator; PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen) eingesetzt und in drei Intervallen zu je 20 Sekunden bei 6500 Umdrehungen pro Minute homogenisiert. Zwischen den einzelnen Intervallen wurde eine Pause von 30 Sekunden eingehalten, um die Schaumbildung, welche die Lyse durch Abbremsen der Kügelchen einschränkt,

sowie eine zu starke Erwärmung (durch Reibung) der Zelllysate zu vermeiden. Im Anschluss an die Lyse wurden die Lysate noch in den Lyse-Röhrchen bei 14 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, um das Lysat von den festen Zellbestandteilen zu isolieren. Alle Nährmedien, Waschlösungen und Lysate wurden bis zum jeweiligen Messtag bei -80 °C gelagert.

Verdau / Aufschluss der Zellen

Zur Bestimmung der Gesamtarsenkonzentration in den Zellpellets (Zellreste nach der Zentrifugation) wurden diese mittels Proteinase K (Qiagen, Hilden) unter Zusatz von Wasserstoffperoxyd (30%ig; Merck, Darmstadt) aufgeschlossen. Durch den Zusatz von H₂O₂ kann sichergestellt werden, dass das Arsen von den Peptiden und anderen zellularen Molekülen abgelöst wird (Naranmandura *et al.*, 2006). Nach dem Verdau wurden die Proben mit ¹⁰³Rh als internen Standard versetzt und auf 1 ml verdünnt. Die Gesamtarsenbestimmung erfolgte mittels ICP-MS. Zur Speziesbestimmung wurde zuvor ein Teil der Probe (wenige µl) mittels HPLC/ICP-MS untersucht.

Analytische Methoden

Als HPLC wurde ein Modell der Firma Agilent (Waldbronn) eingesetzt, welches sich aus einer binären Pumpe sowie einem Probengeber der Serie „Agilent 1100“ zusammensetzte. Die Laufmittel-Zusammensetzung zur As-Speziesbestimmung mittels HPLC ist in Tabelle 46 angegeben. Die Elution der Arsenspezies erfolgte unter isokratischen Bedingungen mit einem Volumenstrom von 1 ml/min. Zur Vermeidung von Temperaturschwankungen wurde eine Säulentemperatur von 30 °C gewählt. Als Säulenofen kam ein Modell der Firma Phenomenex (Aschaffenburg) zum Einsatz (Single-Column Heater; ThermaSphere TS 130). Als analy-

tische Säule wurde eine Luna, 3µ C18(2), 150 x 4,6 mm, Maximaldruck 400 bar Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet.

Tabelle 46: Laufmittelzusammensetzung zur Arsen-Speziesbestimmung mittels Flüssigkeitschromatographie.

Substanz	Konzentration
Wasser	95% (v/v)
Methanol	5% (v/v)
Malonsäure	2 mmol/l
Tetrabutylammonium hydroxide (TBAH)	6 mmol/l
pH – Wert	6,0

Die Injektion erfolgte mittels eines Autosamplers. Das Injektionsvolumen für Standards betrug 0,1 bis 5 µl, für Lysatproben 5 µl.

ICP-MS und HPLC/ICP-MS - Kopplung

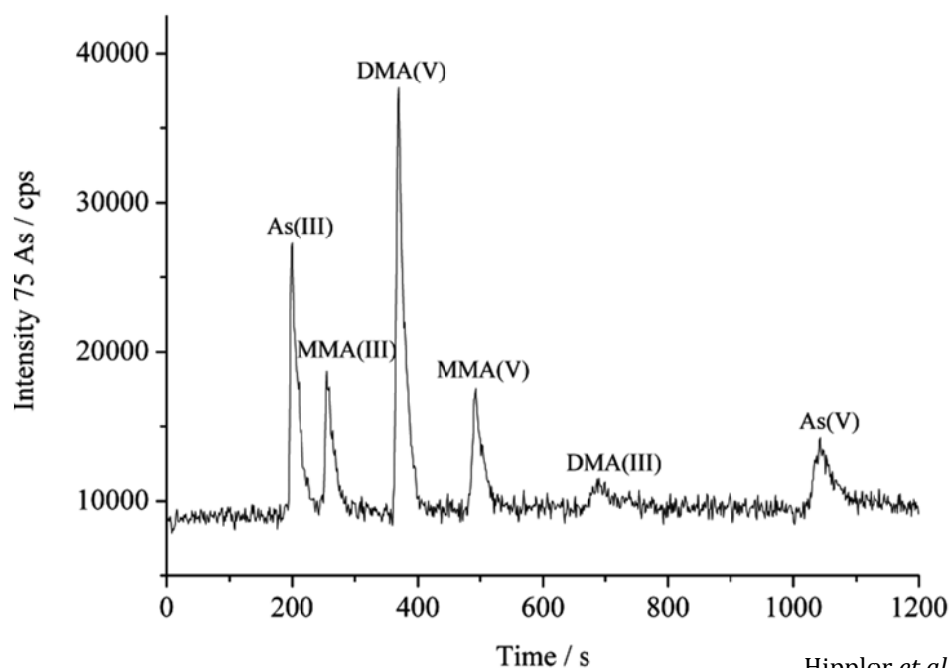
Die Detektion des Arsen-Signals (^{75}As) erfolgte nach Kopplung der HPLC mit einem ICP-MS der Firma Agilent, Modell 7500a. Das Gerät ist mit einem Micro Flow Nebulizer MFN100 aus Fluoropolymeren (Agilent) sowie einer Standardsprühkammer (Quartz, Agilent) ausgestattet. Die wichtigsten methodischen Parameter wie Gasflüsse, RF-Energie, analysierte Isotope usw. sind in

Tabelle 47 aufgeführt. Alternativ wurde für einige Messungen auf ein ebenfalls im Institut für Umweltanalytik vorhandenes Elan 6000 (Perkin Elmer, Rodgau) zurückgegriffen. Als Performance-Test des ICP-MS wurde täglich ein neuer „Tune-Report“ erstellt. Sowohl zur Bestimmung des Gesamtarsens als auch für die Speziesbestimmung (Abbildung 73) mittels HPLC/ICP-MS wurden vergleichbare Parametereinstellungen verwendet. Ein tagestypischer „Tune-Report“ befindet

sich im Anhang. Die Einstellungen und Optimierungen entsprechen denen der eigenen, vorausgegangenen Arbeiten und können dort eingesehen werden.

Tabelle 47: ICP-MS Parameter zur Quantifizierung verschiedener Arsenspezies nach externer Kalibrierung. RF-Energie, Torch-Position und Gasflüsse wurden täglich mit Hilfe der „Tuning-Routine“ optimiert.

ICP-Parameter	Wert
RF - Energie	1580 W
Plasma - Gas	15 l/min (Argon)
Carrier - Gas	~ 0,8 l/min
Make up - Gas	~ 0,25 l/min
Sample depth	5,7 mm
Sprühkammer	Quarz, cooled, 2°C
Analysierte Isotope	^{75}As , ^{35}Cl , ^{77}Ar , ^{37}Cl ^{34}S , ^{71}Ga , ^{73}Ge , ^{115}In , ^{103}Rh



Hippler *et al.* (2011)

Abbildung 73: Typisches Chromatogramm eines Arsen-Multistandards (50 pg As), Säule: Luna®; 3μ.

Das Chromatogramm der Speziesanalyse mittels HPLC/ICP-MS bei Anwendung der beschriebenen Methode zeigt generell eine deutliche Basislinientrennung der einzelnen Signale (Abbildung 73).

4.2.2 Ergebnisse und Diskussion²⁶

Arsenspezifizierung mittels C-18 – Säule

Wie zu Anfang des Kapitels beschrieben blieben bei der Intrazellulären Arsen-Speziesanalyse einige Fragen offen. Es stellte sich u.a. die Frage, ob weitere Spezies wie z.B. Arsenobetain oder Arsenhiospezies mit der angewandten Methode nachgewiesen bzw. getrennt werden können.

Zur Klärung der Frage wurde der bisher verwendete Arsen-Multistandard (As(III), As(V), MMA (III), MMA (V), DMA (V)) zusätzlich mit Arsenobetain (As-Bet) und Monothioarsenat (MTA(V)) versetzt und auf die C18-Säule aufgegeben (50 pg As je Spezies). Abbildung 74 zeigt ein typisches Chromatogramm dieses erweiterten Multi-Arsenstandards, wobei lediglich eine Antrennung von As-Bet und As(III) zu erkennen ist.

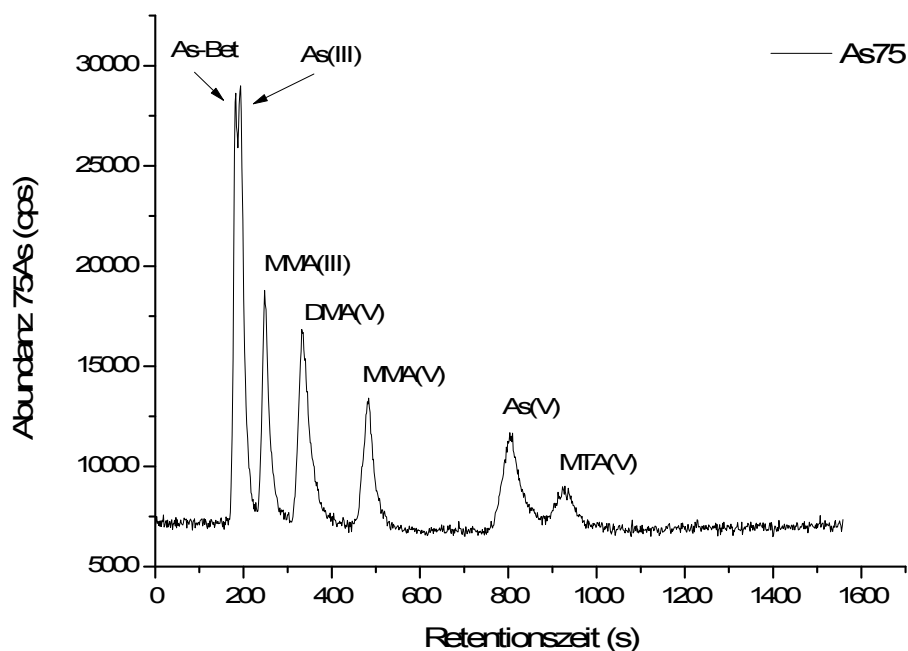


Abbildung 74: Chromatogramm eines Arsen-Multistandards, zusätzlich mit Monothioarsenat (MTA(V)) und Arsenobetain (As-Bet) versetzt; gemessen auf einer C-18 Säule (Luna(R); 3µ).

²⁶ Teile dieser Arbeiten wurde bereits in Hippler *et al.* 2011 publiziert.

Das Chromatogramm zeigt, dass Monothioarsenat (MTA(V)) problemlos mit der verwendeten Säule und dem eingesetzten Laufmittel detektierbar / trennbar ist. Die Retentionszeit dieser Spezies liegt wenig höher als die des Arsenats (As(V)), was für eine Basislinientrennung dieser Spezies aber ausreichend ist.

Anders verhalten sich die Signale von Arsenobetain (As-Bet) und Arsenit (As(III)). Hier fallen beide Peaks bei etwa gleicher Retentionszeit zusammen. Das im Laufmittel eingesetzte TBAH ist ein Ionenpaarreagenz mit positiver Ladung (Abbildung 75). Ionenpaarreagenzien reagieren mit Ionen der zu trennenden Probe, welche eine entsprechend entgegengesetzte Ladung tragen. Dabei

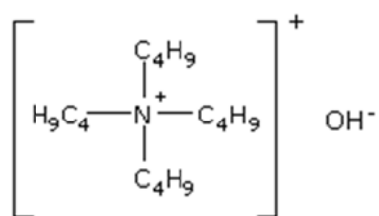


Abbildung 75: Strukturformel des Tetrabutylammoniumhydroxids (TBAH)

entstehen ungeladene Ionenpaare, die an der stationären Phase durch hydrophobe Wechselwirkungen zurückgehalten werden können. Eine Änderung der Laufmittelzusammensetzung sowie des pH-Wertes kann so zu einer veränderten Trennung der Arsenspezies führen. Eine Variation des pH-Wertes im Bereich zwischen 3 und 8 zeigte jedoch keine verbesserte Trennung der beiden

Spezies und führte zudem zu einer Überlagerung anderer Arsenspezies. Auch eine Erhöhung der Konzentrationen von TBAH und Malonsäure im Laufmittel (20 mM Malonsäure, 60 mM TBAH / 10-fach höhere Konzentration) führte nur zu einer geringfügig besseren Trennung von As-Bet und As(III).

Die Literatur beschreibt eine bessere Trennung dieser Spezies bei Verwendung von Weinsäure anstelle von Malonsäure. Daher wurde die Laufmittelzusammensetzung entsprechend geändert, indem die Malonsäure durch die gleich konzentrierte Weinsäure ersetzt wurde (2 mmol/l). Zwar kann tatsächlich eine leichte Verbesserung der Trennung erreicht werden, diese reicht für eine Basislinientrennung aber bei Weitem noch nicht aus (Abbildung 76).

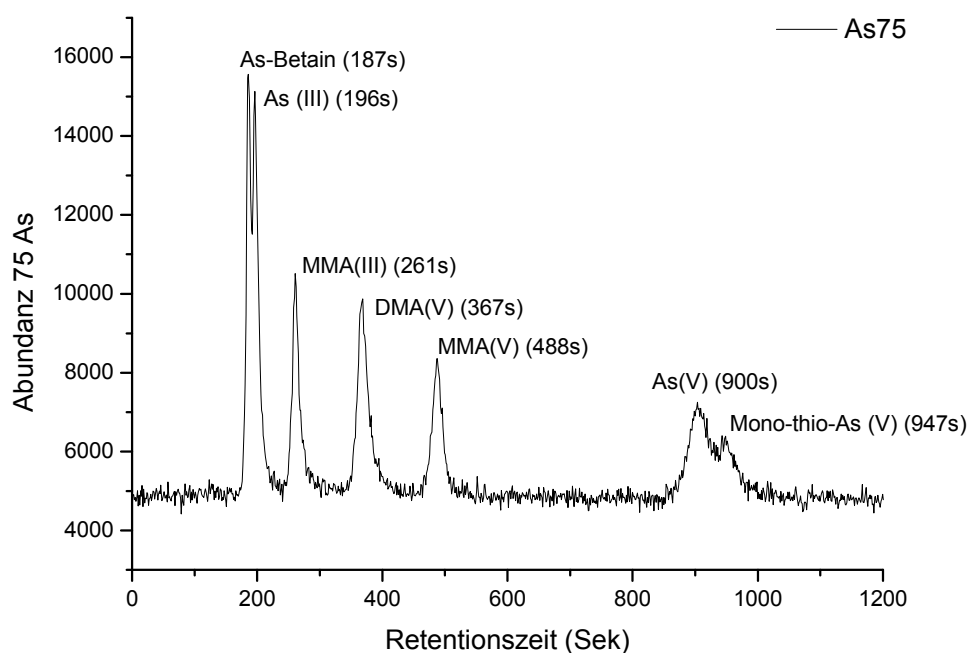


Abbildung 76: Chromatogramm eines Arsen-Multistandards, (incl. Monothioarsenat (MTA(V)) und Arsenobetain (As-Bet)) bei Verwendung von Weinsäure an Stelle von Malonsäure im Laufmittel (Säule: C-18 Säule (Luna(R); 3 μ)).

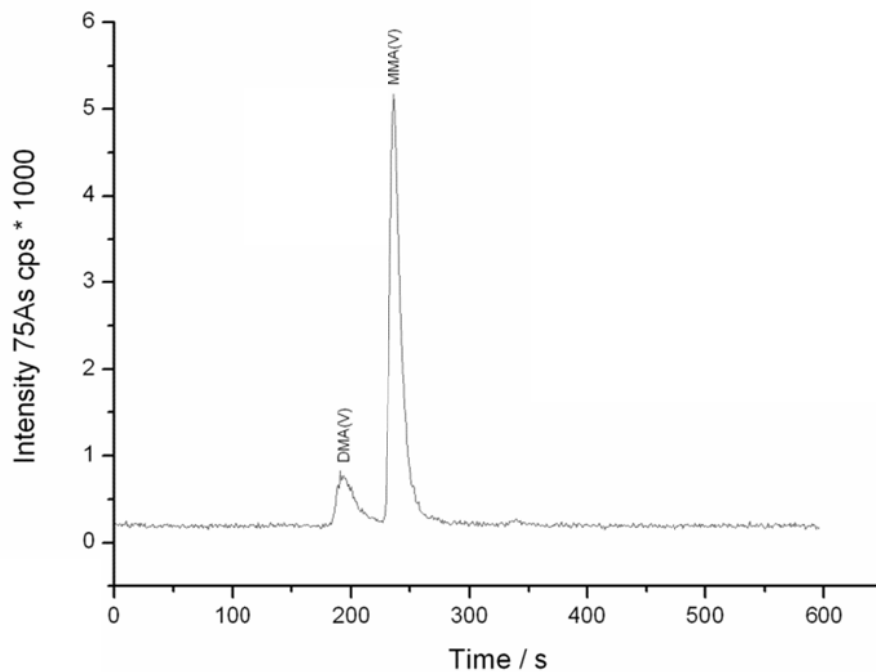
Die Änderung der Laufmittelzusammensetzung bewirkte so zwar eine Verbesserung der Trennung zwischen As(III) und Arsenobetain, führte aber auch zu einer beginnenden Überlagerung von As(V) und MTA(V). Da As-Bet die Hauptspezies im Fisch darstellt und in Zellen nicht zu erwarten war, war es daher sinnvoll auch weiterhin Malonsäure im Laufmittel zu verwenden und auf eine Trennung der As-Bet und As(III) - Spezies zu verzichten. Zudem konnte so sichergestellt werden, dass eine Trennung der Thiospezies möglich ist.

Arsenspezies im Zellrückstand

Auch wenn in dem DFG-Projekt zur „Analyse früher molekularer Veränderungen im Genom arsenexponierter humaner Urothelzellen in Abhängigkeit von der zellulären Aufnahme und der Biotransformation einzelner Arsenspezies“, dem dieses Kapitel zuzuordnen ist, das Hauptaugenmerk auf die Bestimmung von unkonjugierten Arsenspezies liegt, welche bereits hinreichend beschrieben wurden (Hippler, 2011), so sollte doch festgestellt werden, wie viel Arsen in den Zellrückständen vorhanden ist und ob schon dort eine Änderung der Methylierung nachgewiesen werden kann. Daher wurden die Zellrückstände, wie oben beschrieben, zunächst mit Proteinase K und H₂O₂ verdaut und anschließend sowohl die Gesamtarsenkonzentration bestimmt, als auch eine Speziesanalyse mittels HPLC/ICP-MS durchgeführt.

Der für die Analyse der Zellpellets durchgeführte Verdau stellt für die Speziesanalyse ein Problem dar. Aufgrund der oxidativen Bedingungen können im Anschluss an den Verdau lediglich fünfwertige Spezies nachgewiesen werden. Allerdings ist es dennoch möglich Methylierungsprodukte insbesondere Dimethylarsen, falls vorhanden, weiterhin nachzuweisen.

Bei langen Inkubationszeiten (24 Stunden, Abbildung 77) der HepG2-Zellen gegen MMA(III) konnten, neben MMA(V), auch deutliche Mengen an Dimethylarsen in Form von DMA(V) im Zellrückstand nachgewiesen werden (Hippler *et al.*, 2011). Betrachtet man weiterhin die zeitabhängig durchgeführten Expositionszeiten zwischen 5 Minuten und 24 Stunden, so fällt auf, dass innerhalb der ersten drei Stunden lediglich Monomethylarsen in den Zellrückständen nachweisbar ist (Abbildung 78), wobei die Konzentration dieser Spezies innerhalb dieser Zeit langsam ansteigt.



Hippler, *et al.* 2011

Abbildung 77: HPLC/ICP-MS Speziesanalyse des Zellrückstandes von HepG2-Zellen nach 24 stündiger Exposition gegen MMA(III) und anschließendem Verdau.

Bei längeren Expositionszeiten (6 bis 24 h) nimmt diese Konzentration langsam wieder ab und liegt bei 24 Stunden unterhalb der Konzentration, die bereits nach 5 minütiger Inkubationszeit erreicht ist. Die dimethylierte Arsenspezies tritt nachweisbar erst ab Inkubationszeiten auf, die einen Zeitraum von 6 Stunden überschreiten. Aufgrund der geringen Höhe der einzelnen Chromatogramme in Abbildung 78 ist dieses Signal nur als kleiner Anstieg der Basislinie bei einer Retentionszeit von etwa 192 Sekunden zu erkennen. In Abbildung 77 konnte bereits gezeigt werden, dass bei der Einzeldarstellung dieser Chromatogramme aber auch ein solch geringes Signal gut auswertbar ist.

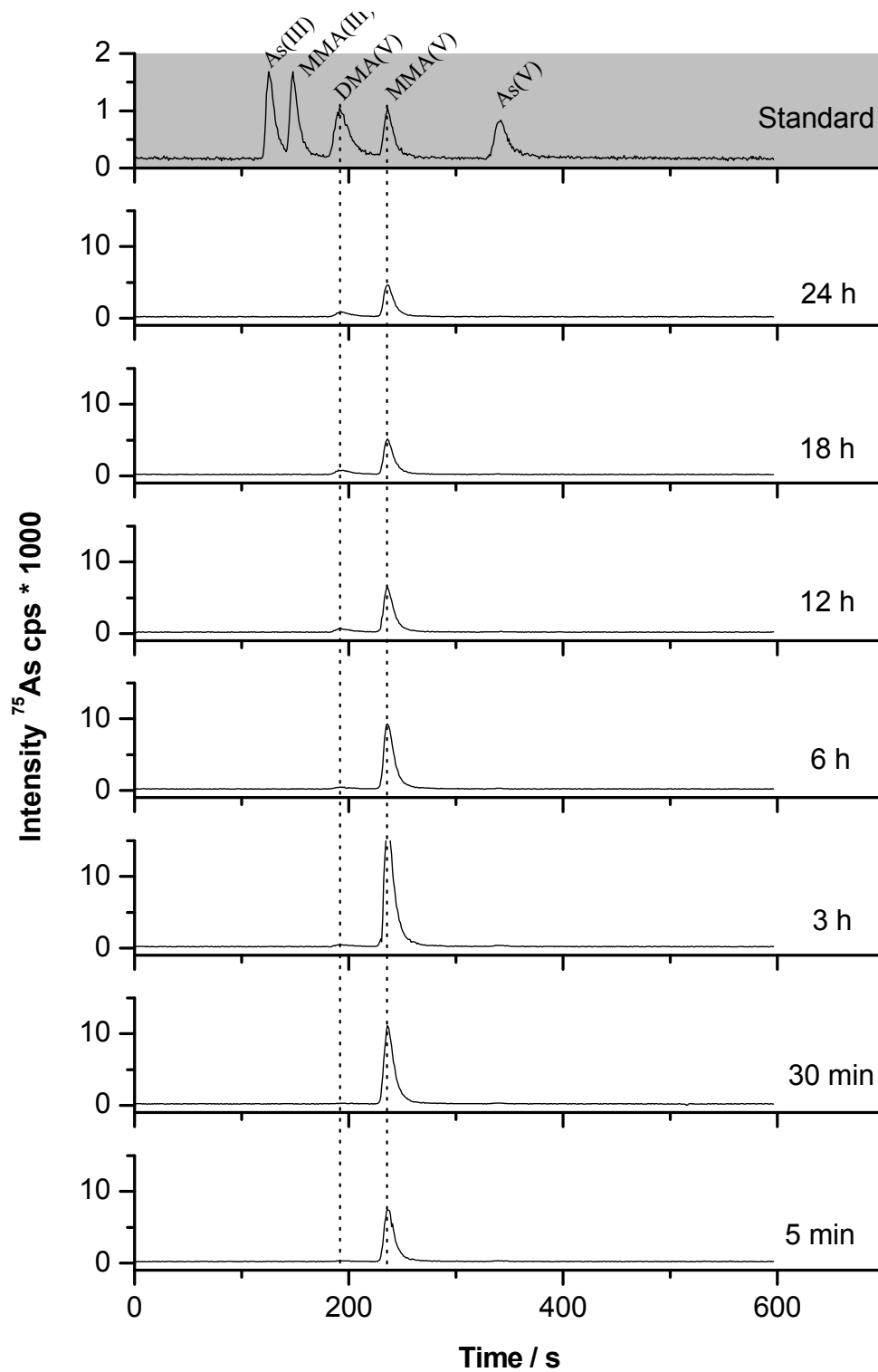
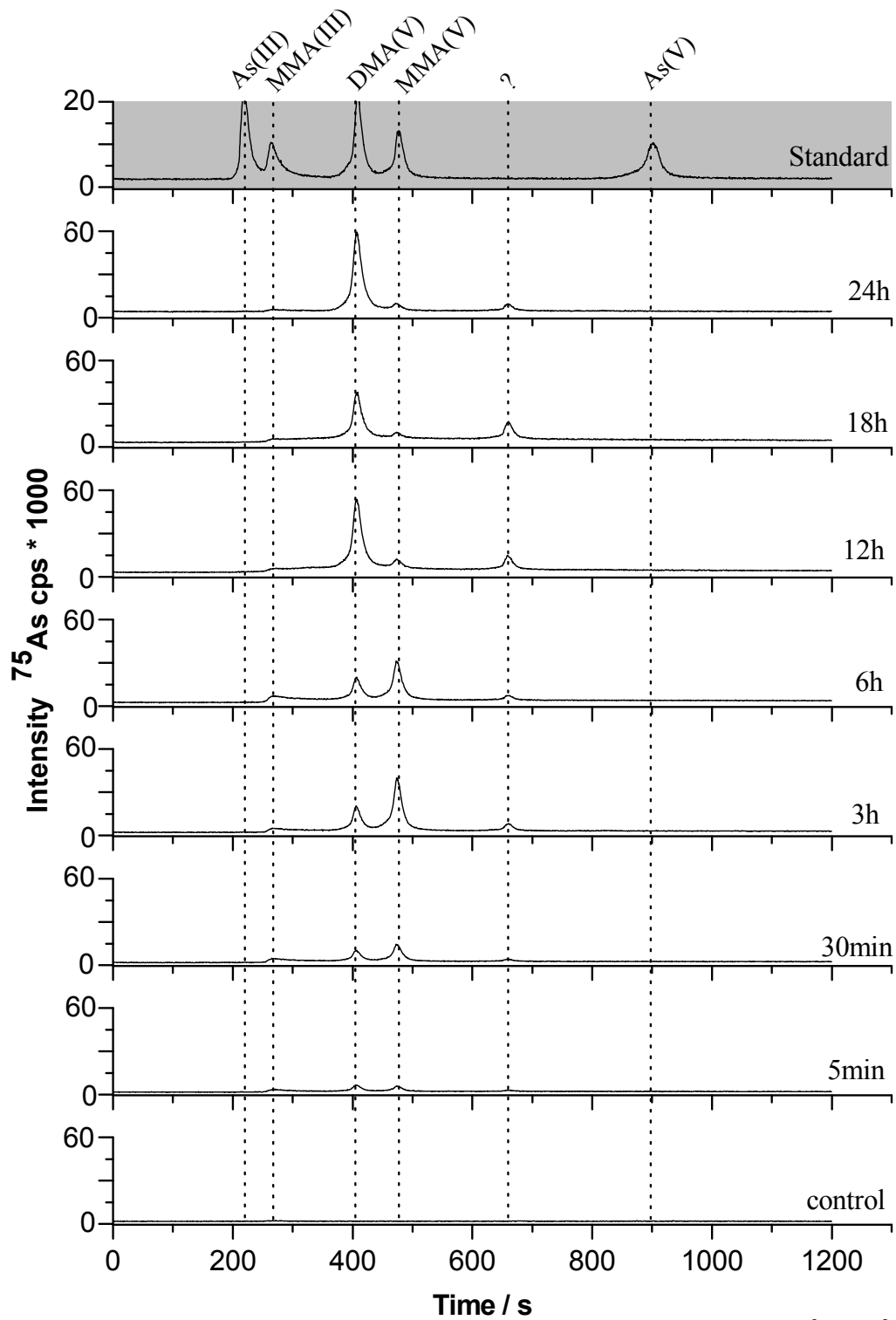


Abbildung 78: Zeitlicher Verlauf der Speziesverteilung im Zellpellet nach Exposition von HepG2-Zellen gegen MMA(III) (5 $\mu\text{mol/l}$) und anschließendem Verdau mittels Proteinase K.

Vergleicht man die zeitliche Speziesverteilung im Zellpellet (Abbildung 78) mit der in den Zelllysaten (Abbildung 79, Hippler *et al.* 2011), so stellt man fest, dass sowohl in den Lysaten, als auch in den Pellets innerhalb der ersten drei Stunden ein Anstieg der MMA(V) Konzentration festzustellen ist. Nach 6 Stunden ist ebenfalls in beiden Fällen ein Rückgang dieser Spezies zu beobachten. Sowohl in den Zellpellets als auch in den Lysaten, hier allerdings wesentlich deutlicher, ist mit der Länge der Expositionszeit ein Anstieg der dimethylierten Spezies (DMA(V)) zu beobachten. Während in den Pellets der Anstieg sehr gering ist, ist er in den Lysaten deutlich ausgeprägt. Interessant ist der Vergleich der Verhältnisse der mono- und dimethylierten Arsenspezies in den Pellets und den Lysaten. In beiden Messreihen (Pellets / Lysate) steigt MMA(V) zunächst an um nach einem Maximum von etwa 3 Stunden wieder abzunehmen. Auch DMA(V) steigt in beiden Reihen, wie beschrieben, früher oder später an. Allerdings ändern sich die Verhältnisse der Spezies zueinander deutlich. In den verdauten Zellpellets bleibt MMA(V) auch bei bis zu 24 stündiger Expositionszeit die vorherrschende Spezies. Ganz anders verhält es sich in den Lysaten. Hier kehren sich die Verhältnisse nach mehr als 6 Stunden Expositionszeit um. Nicht mehr MMA(V) ist die dominierende Spezies, sondern DMA(V). Dies kann als Beleg dafür gedeutet werden, dass eine Methylierung in den Zellen stattfindet und diese methylierte Spezies auch innerhalb der Zellen verbleibt und nur langsam ausgeschleust wird. Monomethylarsen wird von den Zellen in Form von MMA(III) aufgenommen und findet sich daher auch in den Zellmembranen wieder, aus denen es nach dem Verdau und der Oxidation als MMA(V) nachgewiesen werden kann (siehe Kapitel 4.2.3, Seite 201).

Da es sich bei UROtsa um nicht methylierende Zellen handelt, war es wenig überraschend, dass bei der Analyse der Zellrückstände der UROtsa-Zellen lediglich die monomethylierte Arsenspezies nachgewiesen werden konnte, wie es auch in den Zelllysaten der Fall war (Hippler, 2011).

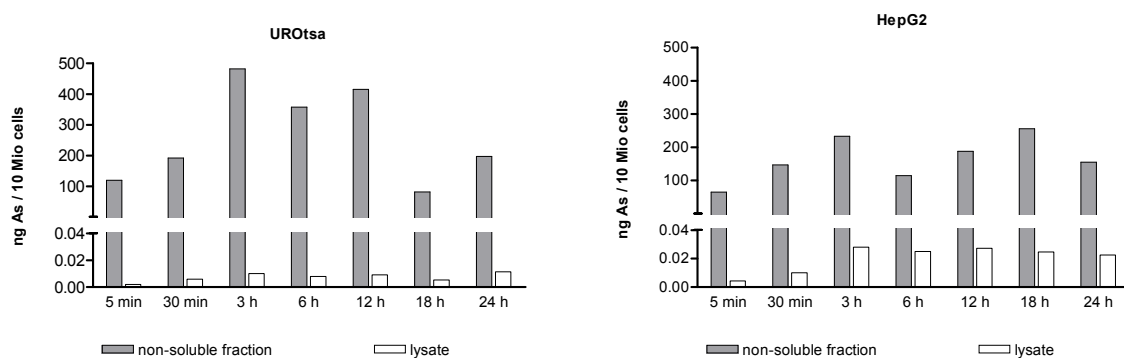


Hippler *et al.* 2011

Abbildung 79: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Speziesverteilung nach Inkubation von HepG2-Zellen gegen MMA(III) (5 $\mu\text{mol/l}$).

Gesamtarsen in den Zellrückständen

Die mittels ICP-MS erstellten Gesamtarsenkonzentrationen in den verdauten Zellpellets zeigen, dass 99,99% des zellulären Arsens an die Zellmembran und/oder andere Zellstrukturen gebunden sind. Nur ein sehr geringer Teil scheint ungebunden in den Lysaten der HepG2 bzw. UROtsa-Zellen vorzuliegen (Abbildung 80).



(Zdrenka *et al.*, 2012)

Abbildung 80: Quantifizierung des Gesamtarsengehaltes in den Lysaten von HepG2 und UROtsa-Zellen im Vergleich zu den Arsenkonzentrationen in den jeweiligen nicht löslichen Fraktionen (Zellpellets).

Eine quantitative Aussage über den Oxidationszustand der an die Zellstrukturen gebundenen Arsenspezies ist kaum möglich. Arsen kann aus diesen Strukturen durch oxidative Prozesse herausgelöst werden (Naranmandura *et al.*, 2006), während dreiwertige Arsenspezies (hier MMA(III)) an den Zellresten gebunden bleiben (Styblo *et al.*, 1997). Ein Vergleich der Gesamtarsenkonzentrationen mit den in den Lysaten gefundenen Arsenspezies (

Abbildung 80) zeigt, dass lediglich etwa 0,01% des ges. Arsens umgehend in freies, unkonjugiertes MMAs(V) umgewandelt werden und so im Lysat detektiert werden können. Dieses „freie“, ungebundene Arsen repräsentiert somit

auch die chemisch aktive Fraktion innerhalb der Zellen, was die Möglichkeit der Methylierung mit sich bringt.

In der Literatur ist es weithin bekannt, dass dreiwertiges Arsen, ganz im Gegensatz zu den pentavalenten Spezies, an Proteine bindet (Yan *et al.*, 2009). In Anbetracht dessen, dass bereits nach 5 Minuten große Mengen des Arsens an der unlöslichen Fraktion gebunden sind, kann man vermuten, dass MMA(III) schnell an die Proteine, die Membranen und andere feste Bestandteile der Zellen bindet. Dies bestätigt sich auch wenn nicht gegen Arsen exponierte Zellpellets (von HepG2 bzw. UROtsa) erst im Nachhinein mit MMA(III) gespiked werden. Auch hier ist nahezu 100% des As mit den nichtlöslichen Zellresten assoziiert.

4.2.3 Zusammenfassung: Arsenzyklus in HepG2 und UROtsa – Zellen

Auch wenn die nicht konjugierten Arsenspezies nur einen sehr kleinen Teil des Gesamtarsens bzw. des in der Zelle gebundenen Arsens ausmachen, so können sie dennoch eine wichtige Rolle im möglichen Metabolismus spielen. Zusammenfassend kann angenommen werden, dass

MMA(III) schnell von HepG2-Zellen aufgenommen wird (Hippler, 2011) und dort an Proteine bindet aber auch teilweise in der Zellmembran verbleibt. Erst einmal in der Zelle angekommen und an die Proteine gebunden, kann dort eine Methylierung stattfinden und es somit zur Bildung einer Dimethylarsenspezies (DMA) kommen, welche sich in der Zelle anreichert (vgl. Abbildung 77, Abbildung 78) und nur langsam nach außen transportiert wird. Durch Arsen geschädigte Proteine können ins Lysosom befördert und dort intrazellulär oxidativ abgebaut werden. Die dabei freigesetzten fünfwertigen

Eigene Publikation

20

Intracellular Arsenic Speciation and Quantification in Human Urothelial and Hepatic Cells

Ricardo Zdrénka, Joerg Hippler, Georg Johnen, Alfred V. Hirner and Elke Diep
University of Duisburg-Essen, Ruhr-University Bochum, University Hospital Essen
Germany

1. Introduction

Arsenic can be found in nearly every part of the geosphere. It is viewed as the most harmful toxin in drinking water worldwide. At many places on earth the drinking water contains concentrations above 10 µg/L, which significantly exceed the guideline value recommended by the WHO (World Health Organization [WHO], 2011). This is considered as a health threat for millions of people, especially in Bangladesh, Vietnam, and Latin America, where the arsenic crisis has already been proved (Dö, *et al.*, 2011). The sources of this considerable arsenic occurrence (Fig. 1) are geogenic (arsenic) mining activities, and geothermal waters (Goswami & Kumbhkar, 2002).



Fig. 1. Map of arsenic affected aquifers (Goswami & Kumbhkar, 2002).
The main arsenic species detected in drinking water are arsenite and arsenate. But the geothermal waters (Hot Spots) in the Yellowstone Nationalpark, USA, predominantly contain several mg/L of methylated thioarsenicals such as monomethyl-, dimethyl-, and trimethylarsenate, as

(Zdrénka *et al.*, 2012)

Arsenmetabolite (namentlich MMA(V) und DMA(V)) können entweder ausgeschieden oder innerhalb der Zelle durch Antioxidantien wie Glutathion (vgl. Hayakawa-Mechanismus (Hayakawa *et al.*, 2005)) reduziert und so erneut an Proteine gebunden werden (Abbildung 81, links). Nach dem Durchlaufen des Mechanismus liegt ein Großteil des aufgenommenen MMA(III) methyliert in Form von DMA(V) vor, welches als Hauptmetabolit bei Arsenexposition bekannt ist und ausgeschieden wird.

Die detaillierte Diskussion des oxidativen Abbaus im Lysosom der HepG2-Zellen geht auf die freundliche Unterstützung des Projektpartners G. Johnen am IPA in Bochum (Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung) zurück. Der Abschnitt kann in der im Anhang verfügbaren Publikation (Hippler *et al.*, 2011) nachgelesen werden.

Für eine Methylierung in UROtsa-Zellen konnten keine Hinweise, weder in den Lysaten noch in den Zellpellets, gefunden werden. Aber auch für diese Zellart kann ein oxidativer Abbau im Lysosom der Zellen angenommen werden. Der Pfad bzw. Kreislauf der Methylierung, wie er für die HepG2-Zellen vorgeschlagen wurde, fällt bei den UROtsa-Zellen jedoch weg. Somit beschränkt sich das Schema im Vergleich zu den Hepatozyten auf eine Oxidation in den Lysosomen sowie einer Reduktion durch Antioxidantien im Cytosol und einem möglichen Ausscheiden des MMA(V) aus den Zellen (Abbildung 81, rechts).

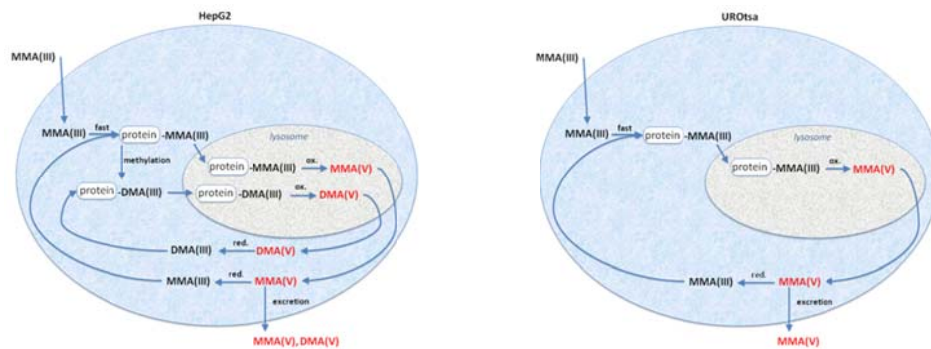


Abbildung 81: Vorgeschlagener intrazellulärer Arsenzyklus in HepG2 (links) und UROtsa – Zellen (rechts) nach Exposition gegen MMA(III) (Zdrenka *et al.*, 2012)

Besonders die dreiwertigen Arsenspezies zeigen nicht nur zytotoxische, sondern auch starke genotoxische Effekte. Diese können entweder in Form von DNA-Schäden mittels eines Mikrokerntests (Micronucleus-Test, MNT) oder eines Comet-Tests bzw. durch Chromosomenaberration nachgewiesen werden. Bei den hier durchgeführten Experimenten konnten neben den zytotoxischen auch signifikante genotoxische Effekte bei allen getesteten trivalenten Arsenspezies (As(III), MMA(III), DMA(III)) bereits nach 30 minütiger Exposition nachgewiesen werden. Auf diese Effekte wird allerdings in der Dissertation von R. Zdrenka (Zdrenka, in Vorbereitung (2012)) weiter eingegangen und sind nicht Teil dieser Arbeit.

4.3 Anmerkungen zu den verwendeten UROtsa – Zellen

Das Urothel bildet das Deckepithel der ableitenden Harnwege und zeichnet sich durch seine Anpassungsfähigkeit an Volumenschwankungen aus. Man findet dieses im Harnleiter, der Harnblase sowie im Nierenbecken (Schmitz, 2007), in denen sie in mehreren Schichten angeordnet sind (Kühnel, 1989). Bei der Zelllinie UROtsa handelt es sich um immortalisiert Urothelzellen (Petzoldt *et al.*, 1995), welche vielfältig eingesetzt, kultiviert und weitergegeben wird. In den verschiedenen durchgeführten Expositionsexperimenten der UROtsa - Zellen gegen MMA(III) (DFG-Projekt „Analyse früher molekularer Veränderungen im Genom arsenexponierter humaner Urothelzellen in Abhängigkeit von der zellulären Aufnahme und der Biotransformation einzelner Arsenspezies“) sollten primär die Fragen beantwortet werden, welchen Beitrag die einzelnen Arsenspezies zur Harnblasenkanzerogenität leisten, ob die Arsenspezies im Blut oder im Urin zur Tumorentstehung in der Harnblase beitragen und über welche Mechanismen es zur malignen Entartung der Urothelzellen kommt.

Zur Untersuchung der malignen Entartung von Harnblasenzellen wurden diese über 80 Wochen zweimal wöchentlich gegen MMA(III) (50 nM, 75 nM, 100 nM) und As(III) (50 nM) exponiert. Alle 4 Wochen wurden Proben aus diesen Kulturen entnommen, die molekularbiologisch untersucht wurden. Zusätzlich wurden Proben aus den Kulturen in einem Koloniebildungs-Assay untersucht (Zdrenka *et al.*, 2012). Zur Bestimmung von miRNAs wurden Real-Time PCR-basierte TaqMan-Assays etabliert. Zudem wurde COX2 (offizieller Genname: PTGS2) ausgewählt, um dessen Expression auf der mRNA- und Protein-Ebene zu erfassen (Zdrenka *et al.*, 2010). Das COX2-Protein unterdrückt die Apoptose, fördert die Proliferation und spielt eine Rolle bei vielen Krebsentstehungsprozessen, einschließlich Blasenkrebs und arseninduzierter Transformation von UROtsa-Zellen (Eblin *et al.*, 2008). In den durchgeführten Expositionsexperimenten der UROtsa - Zellen gegen MMA(III) zeigten sich aber immer wieder Auffälligkeiten in der Zelllinie. Daher wurden für diese Zellart weitere Untersuchungen durchgeführt, die die Identität dieser Zellen eindeutig nachweisen sollten.

Auf verschiedenen molekularen Ebenen wurde dabei eindeutig nachgewiesen, dass es sich bei den verwendeten "UROtsa"-Zellen tatsächlich um die urotheliale Krebszelllinie T24 handelt. Der Zeitpunkt der Kreuzkontaminierung der ursprünglichen, authentischen UROtsa-Zelllinie mit T24-Zellen ist nicht bekannt, wird aber vermutlich vor 2004 stattgefunden haben (Johnen *et al.*, eingereicht).

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit gibt einen breit gefächerten Einblick in die Speziesanalytik ausgewählter metall(oid)organischer Verbindungen in biologischen und umweltrelevanten Systemen. Teile dieser Arbeit sind bereits in internationalen Zeitschriften publiziert (siehe Anhang bzw. Publikationsliste), andere wurden hier erstmalig vorgestellt. Im Folgenden sollen die einzelnen Arbeiten nochmals zusammenfassend und projektübergreifend dargestellt werden:

Erstmalig wurden hier Biogasanlagen auf leichtflüchtige, methylierte metall(oid)organische Verbindungen im Biogas, Anmaischbecken, Nachgärer und Gaskondensat untersucht.

In allen untersuchten Biogasen konnten permethylierte, metall(oid)organische Verbindungen vom Spurenbereich bis hin zu mehreren tausend ng/m³ (Me₃Sb) nachgewiesen werden, wobei sich teilweise große Unterschiede in den Proben innerhalb einer Anlage zeigten. Der Vergleich dieser Werte mit anderen Hotspots wie Deponie- oder Klärgasen hat gezeigt, dass diese Konzentrationen durchaus miteinander vergleichbar sind, wobei für Me₃Sb Konzentrationen ermittelt wurden, die über die s.g. Effekt-Konzentration von 10³ ng/m³ hinausgehen. Auffallend waren die eher geringen Konzentrationen von Me₂Hg. Diese liegen im Klär- und Deponiegas oft deutlich höher. Stattdessen war im Biogas Hg⁰ die dominierende Hg-Spezies, was mit den meist großen Mengen an schwefelhaltigen Verbindungen und den reduzierenden Bedingungen erklärt werden kann, die die Bioverfügbarkeit des Quecksilbers reduzieren und die Methylierungsraten verringern können.

Auch in den Kondensaten der Biogasanlagen waren teil- und permethylierte Verbindungen (Me₃As, Me₃Sb und Me₂Hg) nachweisbar. Gerade für Antimon zeigte sich hier eine große Speziesverteilung. Im Gegensatz zum Biogas, in dem hauptsächlich Hg⁰ vorlag, war im Kondenswasser Dimethyl- bzw. Monomethylquecksilber die vorherrschende Spezies.

Wie im Anmaischbecken treten auch in den Chromatogrammen der Kondensate unbekannte Quecksilbers- und Antimonspezies auf. Auch in den Nachgärern konnten methylierte Spezies nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Anmaischbecken waren in den Nachgärern sowohl geringere Konzentrationen als auch eine veränderte Spezieszusammensetzung zu beobachten. Bei der HPLC-Analyse der filtrierten Proben aus den Anmaischbecken, Nachgärern und Kondensaten konnten, neben As(III) und DMA(V) auch weitere, unbekannte Arsen-spezies nachgewiesen werden. Eine Massenbilanz der Metall(oid)konzentrationen in den Biogasanlagen war leider nicht möglich, da weder das Volumen des abgeschiedenen Kondenswassers noch die Massen/Volumina der Anmaischbecken, Nachgärer sowie das gebildete Biogasvolumen bekannt sind. Um weitere Aussagen über die Bildung metall(oid)organischer Verbindungen treffen zu können, ist eine weitaus genauere Betrachtung der einzelnen Anlagen mit mehrmaligen Probennahmen unter kontrollierten Bedingungen notwendig. Das durchgeführte Screening dieser hier beschriebenen Anlagen hat aber gezeigt, dass in Biogasanlagen metall(oid)organische Verbindungen gebildet und nachgewiesen werden können.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen an Biogasanlagen wurden auf dem „Fachgespräch Feststoffuntersuchung“ des Ministeriums für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (LANUV, Essen, 2012) sowie auf der ANAKON 2013 in Essen (Posterbeitrag) vorgestellt und diskutiert.

Auch wenn es bei der Betrachtung der Fermenter zu vermuten ist, handelt es sich bei Biogasanlagen keineswegs um geschlossene Systeme, auch wenn die Fermenter mit einer Plane überspannt sind.

Wie die Untersuchungen verschiedener Handschuhmaterialien mit der hier entwickelten Permeationszelle gezeigt haben, sind viele Kunststofffolien keine allzu große Barriere für metall(oid)organische Verbindungen, wobei generell nur wenige Daten über Durchbruchzeiten metall(oid)organischer Verbindungen durch z.B. Handschuhmaterialien vorhanden sind.

Mit der neu gestalteten Messzelle konnte für Me_2Hg eine Durchbruchzeit von 11 Sekunden bei Latexhandschuhen ermittelt werden, was in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur vorhandenen Daten steht. Auch die für Methanol ermittelte Durchbruchzeit von 45 Sekunden zeigt eine gute Vergleichbarkeit mit den genormten Verfahren (Durchbruchzeit: 50 Sekunden). Mit der hier verwendeten Methode wurde so eine schnelle, sichere und praktikable Möglichkeit geschaffen, um abzuschätzen, welches Material sich für die Handhabung einzelner metall(oid)organischer Verbindungen am besten eignet bzw. welche Materialien keinesfalls genutzt werden sollten. Latex- und Vinylhandschuhe boten kaum Schutz gegen diese Verbindungsklasse. Auch Nitrilhandschuhe waren nur sehr eingeschränkt tauglich. Wirklichen Schutz gegen alle getesteten Substanzen boten nur die mehrlagigen Handschuhe. Die Einführung einer zusätzlichen Klasse für Metallorganik in die Liste der Prüfchemikalien (Tabelle 33, Seite 139) wäre wünschenswert, ist aber wohl kaum möglich. Allein die Festlegung der entsprechend zu verwenden Prüfchemikalie würde schwierig, da die einzelnen Verbindungen (z.B. Me_2Hg und Me_4Sn) extrem unterschiedliche Durchbruchzeiten zeigten. Ein weiterer Vorteil der hier vorgestellten Messzelle ist die eingebaute Heizspirale unterhalb des Probenmaterials, mit der der Forderung nach praxisnahen und realistischen Bedingungen der Handschuhinnentemperatur ($\sim 33^\circ\text{C}$) Rechnung getragen wird. Die Kopplung der Permeationszelle mit einem ICP-MS stellte zudem eine schnelle und sehr empfindliche Möglichkeit dar Durchbruchzeiten metall(oid)organischer Verbindungen durch Folien bzw. Membranen zu bestimmen.

Die Fähigkeit metall(oid)organischer Verbindungen Barrieren, wie etwa Membranen oder die Haut, leicht zu durchdringen konnte genutzt werden um so die toxischen Wirkungen leichtflüchtiger Verbindungen besser untersuchen zu können. Da direkte toxikologische Tests mit leichtflüchtigen metall(oid)organischen Verbindungen aufgrund ihrer geringen Stabilität und oft schlechten Löslichkeit im Zellmedium äußerst problematisch sind, wurde ein neues Expositionssystem entwickelt um zyto- sowie genotoxische Effekte von volatilen metall(oid)organischen Verbindungen untersuchen zu können. Die mit diesem Ex-

positionssystem erhaltenen Ergebnisse zeigten u. a., dass Dimethylquecksilber, gefolgt von Dimethylarsiniodid, für alle drei getesteten Zelllinien (CHO-9, CaCo, Hep-G2) die höchste, Tetramethylzinn verglichen mit den anderen getesteten Spezies die geringste zytotoxische Wirkung aufweist. Stärker als erwartet war die toxische Wirkung vom jeweiligen Zelltyp abhängig, was mit unterschiedlichen Aufnahmeprozessen erklärt werden konnte. Neuere Untersuchungen deuten auf eine vergleichsweise geringe akute Toxizität von Trimethylarsin hin (Cullen *et al.*, 2005) was mit den hier durchgeführten Expositionsversuchen bestätigt werden konnte. Während anorganisches Bismut als weitgehend ungiftig gilt, konnten mittels der hier eingesetzten Expositions-kammer für methylierte Bismutspezies (Me_3Bi) deutliche toxikologische Effekte beobachtet werden. Zudem konnte generell gezeigt werden, dass alle leichtflüchtigen metall(oid)organischen Verbindungen schon bei geringer Konzentration eine signifikante zytotoxische Wirkung gegen humane Zellen zeigen. Allerdings ist dies abhängig von dem jeweiligen Metall(oid) sowie des Zelltyps. Der Großteil dieser Arbeiten wurde bereits im „Journal of Toxicology unter dem Titel: Toxicity of volatile methylated species of Bismut, arsenic, tin and mercury in mammalian cells in vitro “ publiziert (Dopp *et al.*, 2011).

Für Arsen wird meist die unterschiedliche Aufnahme einzelner Spezies in die Zellen für deren toxikologische Wirkung verantwortlich gemacht und MMA(III) als wichtiger Metabolite im humanen Arsenzyklus beschreiben. Im Rahmen eigener, vorangegangener Arbeiten wurden bereits die analytischen Grundlagen zur intrazellulären Arsenspezifizierung geschaffen. Zur Weiterführung dieser Arbeiten wurden hier erneut Zellen gegen MMA(III) exponiert, aufgearbeitet und analytisch untersucht. Die in der Literatur beschriebene verbesserte Trennung der Arsenspezies bei Verwendung von Weinsäure anstelle von Malonsäure konnte dabei nicht bestätigt werden. Eine Änderung der Laufmittelzusammensetzung bewirkte lediglich eine Antrennung von As(III) und Arsenobetain (As-Bet). Da As-Bet in den Zellextrakten nicht zu erwarten war, war es sinnvoll auch weiterhin Malonsäure im Laufmittel zu verwenden, da auf diese Weise auch Monothioarsenat (MTA(V)) problemlos mit der verwendeten Säule und dem einge-

setzten Laufmittel detektierbar / trennbar war. Zudem konnte gezeigt werden, dass geringe Chloridkonzentrationen kaum einen Einfluss auf die Trennung haben.

In den Zellrückständen der gegen MMA(III) exponierten Zellen konnte nach deren Verdau sowohl die Gesamtarsenkonzentration bestimmt, als auch eine zeitabhängige Speziesanalyse mittels HPLC/ICP-MS durchgeführt werden. Interessant war der Vergleich der Verhältnisse der mono- und dimethylierten Arsenspezies in den Pellets und den Lysaten. Dieser Vergleich kann als Beleg dafür gedeutet werden, dass eine Methylierung in den Zellen stattfindet, diese methylierte Spezies innerhalb der Zellen verbleibt und nur langsam ausgeschleust werden. Ein Vergleich der Gesamtarsenkonzentrationen mit den in den Lysaten gefundenen Arsenspezies zeigte, dass lediglich etwa 0,01% des ges. Arsens umgehend in freies, unkonjugiertes MMAs(V) umgewandelt wurde und so im Lysat detektiert werden konnte. Aus den Ergebnissen konnte gefolgert werden, dass MMA(III) schnell von HepG2-Zellen aufgenommen wird, dort eine Methylierung stattfindet und es somit zur Bildung einer Dimethylarsenspezies (DMA) kommt. Durch das Arsen geschädigte Proteine können ins Lysosom befördert und dort intrazellulär oxidativ abgebaut werden. Für eine Methylierung in UROtsa-Zellen konnten keine Hinweise, weder in den Lysaten noch in den Zellpellets, gefunden werden. Große Teile dieser Arbeiten wurden bereits in Hippler *et al.* 2011 und Zedrenka *et al.* 2012 publiziert. Auf verschiedenen molekularen Ebenen wurde zudem eindeutig nachgewiesen, dass es sich bei den verwendeten "UROtsa"-Zellen tatsächlich um die urotheliale Krebszelllinie T24 handelt (Johnen *et al.*, eingereicht).

Literaturverzeichnis

Agentur für Erneuerbare Energien e.V. (2011) *Der volle Durchblick in Sachen Energiepflanzen*. DMP-Druck, Berlin.

American Cancer Society (17. 03. 2011). *www.cancer.org*, Abgerufen am 13.02.2012 von <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002870-pdf.pdf>

Ammann A (2007) Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *Journal of Mass Spectrometry* (42) 419–427.

Amouroux D, Tessier E, Pécheyran C, Donard O (1998) Sampling and probing volatile metal(loid) species in natural waters by in-situ purge and cryogenic trapping followed by gas chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry (P-CT-GC-ICP/MS). *Analytica Chimica Acta* (377) 241-254.

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften (2003) *Richtlinie 2003/2/EG der Kommission vom 6. Januar 2003 über Beschränkungen des Inverkehrbringens und der Verwendung von Arsen*. L 4/9 - L 4/11.

Andrewes P, Cullen W, Polishchuk E (2000) Antimony biomethylation by *Scopulariopsis brevicaulis*: characterization of intermediates and the methyl donor. *Chemosphere* (41) 1717-1725.

Antman K (2001) The History of Arsenic Trioxide in Cancer Therapy. *The Oncologist* (6 (suppl 2)) 1-2.

Aposhian H (1997) Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (37) 397-419.

Aschner M, Clarkson T (1988) Uptake of Methylmercury in the Rat-Brain - Effects of Amino-Acids. *Brain Research* (462) 31-39.

Aschoff J, Never R (1958) Kern und Schale im Wärmehaushalt des Menschen. *Die Naturwissenschaften* (20) 477-485.

ASTM F 739-99a (1999) Standard test method for resistance of protective clothing materials to permeation by liquids or gases under conditions of continuous contact. *American Society of Testing and Materials*. (ASTM F 739-99a).

Banning A, Coldewey W, Göbel P (2009) A procedure to identify natural arsenic sources, applied in an affected area in North Rhine-Westphalia, Germany. *Environmental Geology* (57) 775-787.

Becker J (2007) *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Wiley, West Sussex.

Bentley R (2001) Bartolomeo Gosio, 1863-1944: An Appreciation. *Advances in Applied Microbiology* (48) 229-250.

Bentley R, Chasteen T (2002) Microbial Methylation of Metalloids: Arsenic, Antimony, and Bismuth. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (66) 250-271.

Bittig M (2011) *Zum Einfluss unterschiedlicher Liganden auf die Quecksilberabscheidung in adsorptiven Abgasreinigungsstufen*. Shaker, Aachen.

Blayney M (2001) The Need for Empirically Derived Permeation Data for Personal Protective Equipment: The Death of Dr. Karen E. Wetterhahn. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* (16) 233-236.

Boertz J, Hartmann L, Sulkowski M, Hippler J, Mosel F, Diaz-Bone R, Michalke K, Rettenmeier A, Hirner A (2009) Determination of Trimethylbismuth in the Human Body after Ingestion of Colloidal Bismuth Subcitrate. *Drug Metabolism and Disposition* (37) 352-358.

Böhm E, Hillenbrand T, Marscheider-Weidemann F (2002) *Ermittlung der Quellen für die prioritären Stoffe nach Artikel 16 der Wasserrahmenrichtlinie und Abschätzung ihrer Eintragsmengen in die Gewässer in Deutschland*. Umweltbundesamt, Berlin, Bd. UBA-Texte 68/02.

Bridges C, Zalups R (2005) Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology and Applied Pharmacology* (204) 274-308.

Bridges C, Zalups R (2006) Molecular Mimicry as a Mechanism for the Uptake of Cysteine S-Conjugates of Methylmercury and Inorganic Mercury. *Chemical Research in Toxicology* (19) 1117-1118.

Bringezu S (1990) Arsen im Holzschutz. *Holz als Roh- und Werkstoff* (48) 237-243.

Buge A, Rancurel C (1976) Clinical-Study on Bismuth related Encephalopathy. *Semaine des Hopitaux Therapeutique* (52) 514-514.

Burford N, Eelman M, Mahony D, Morash M (2003) Definitive identification of cysteine and glutathione complexes of bismuth by mass spectrometry: assessing the biochemical fate of bismuth pharmaceutical agents. *Chemical Communications* (1) 146-147.

Burns R, Thomas D, Barron V (1974) Reversible Encephalopathy Possibly Associated with Bismuth Subgallate Ingestion. *Australian and New Zealand Journal of Medicine* (4) 109-110.

Campbell A (1992) A critical survey of hydride generation techniques in atomic spectroscopy. *Pure and Applied Chemistry* (64) 227-244.

Carrero P, Malavé A, Burguera J, Burguera M, Rondón C (2001) Determination of various arsenic species by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry: investigation of the effects of the acid concentration of different reaction media on the generation of arsines. *Analytica Chimica Acta* (438) 195-204.

Challenger F (1945) Biological Methylation. *Chemical Reviews* (36) 315-361.

Challenger F (1951) Biological methylation. In: Nord F. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, Interscience Publishers LTD., London, Bd. 12, 429-491.

Challenger F, Higginbottom C, Ellis L (1933) The formation of organo-metalloidal compounds by microorganisms. Part I. Trimethylarsine and dimethylethylarsine. *Journal of the Chemical Society* 95-101.

Chapman H, Johnson Z (2002) Use of Antibiotics and Roxarsone in Broiler Chickens in the USA: Analysis of the Years 1995 to 2000. *Poultry Science* (81) 356-364.

Chasteen T, Wiggli M, Bentley R (2002) Of garlic, mice and Gmelin: the odor of trimethylarsine. *Applied Organometallic Chemistry* (16) 281-286.

Cleckner L, Garrison P, Hurley D, Krabbenhoft D, Olson M (1998) Trophic transfer of methyl mercury in the northern Everglades. *Biogeochemistry* (40) 347-361.

Craig P (2003) *Organometallic Compounds in the Environment*. Wiley, West Sussex.

Craig P, Jenkins R, Dewick R, Miller D (1999) Trimethylantimony generation by *Scopulariopsis brevicaulis* during aerobic growth. *Science of The Total Environment* (229) 83-88.

Craig P, Jenkins R, Stojak G (1999) The analysis of inorganic and methyl mercury by derivatisation methods; opportunities and difficulties. *Chemosphere* (39) 1181-1197.

Cullen W (2008) *Is Arsenic an Aphrodisiac? The Sociochemistry of an Element*. RSC Publishing, Cambridge.

Cullen W, Bentley R (2005) The toxicity of trimethylarsine: an urban myth. *Journal of Environmental Monitoring* (7) 11-15.

Dekker M (1990) Packings and stationary phases in chromatographic techniques. In: Unger K. *Chromatographic Science Series*, CRC Press, New York.

Diaz-Bone R, Hitzke M (2008) Multi-element organometal(loid) speciation by hydride generation-GC-ICP-MS: overcoming the problem of species-specific

optima by using a pH-gradient during derivatisation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (23) 861-870.

Diaz-Bone R, Raabe M, Awißus S, Keuter B, Menzel B, Küppers K, Widmann R, Hirner A (2011) Investigation of biomethylation of arsenic and tellurium during composting. *Journal of Hazardous Materials* (189) 653-659.

DIN EN 374-1 (2003) Schutzhandschuhe gegen Chemikalien und Mikroorganismen - Teil 1: Terminologie und Leistungsanforderungen. *Deutsches Institut für Normung e.V. (Ausgabedatum: 2003-12-00)*.

DIN EN 374-3 (2003) Schutzhandschuhe gegen Chemikalien und Mikroorganismen - Teil 3: Bestimmung des Widerstandes gegen Permeation von Chemikalien. *Deutsches Institut für Normung e.V. (Ausgabedatum: 2003-12-00)*.

Dodd M, Grundy S, Reimer K, Cullen W (1992) Methylated antimony(V) compounds: Synthesis, hydride generation properties and implications for aquatic speciation. *Applied Organometallic Chemistry* (6) 207-211.

Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W (2005) *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. Thieme, Stuttgart.

Dopp E (2007) Neue Aspekte zur Arsen-induzierten Kanzerogenese. *ErgoMed* (4) 100-109.

Dopp E, Hartmann L, Florea A, von Recklinghausen U, Pieper R, Shokouhi B, Rettenmeier A, Hirner A, Obe G (2004) Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* (201) 156-165.

Dopp E, Hartmann L, von Recklinghausen U, Florea A, Rabieh S, Zimmermann U, Yadav S, Hirner A, Rettenmeier A (2005) Forced uptake of trivalent and pentavalent methylated and inorganic arsenic and its cyto-/genotoxicity in fibroblasts and hepatoma cells. *Toxicological Sciences* (87) 46-56.

Dopp E, Kligermann A, Diaz-Bone R (2010) Organoarsenicals, Uptake, Metabolism, and. In: Sigel A, Sigel H, Sigel R. *Metal Ions in Life Sciences*, RSC Publishing, Cambridge, Bd. 7, 231-265.

Dopp E, von Recklinghausen U, Hippler J, Diaz-Bone R, Richard J, Zimmermann U, Gerhards M, Rettenmeier A, Hirner A (2011) Toxicity of volatile methylated species of bismuth, arsenic, tin and mercury in mammalian cells in vitro. *Journal of Toxicology* (Article ID 503576) 7.

Drobná Z, Walton F, Paul D, Xing W, Thomas D, Stýblo M (2010) Metabolism of arsenic in human liver: the role of membrane transporters. *Archives of Toxicology* (84) 3-16.

D'Ulivo A, Mester Z, Sturgeon R (2005) The mechanism of formation of volatile hydrides by tetrahydroborate(III) derivatization: A mass spectrometric study performed with deuterium labeled reagents. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* (60) 423-438.

Dunemann L, Begerow J (1995) *Kopplungstechniken zur Elementspezies - Analytik*. VCH, Weinheim.

Eblin K, Bredfeldt T, Gandolfia A (2008) Immortalized human urothelial cells as a model of arsenic-induced bladder cancer. *Toxicology* (248) 67-76.

Edmonds J, Francesconi K (2003) Organic Compounds in the Marine Environment. In: Craig P. *Organometallic Compounds in the Environment*, Wiley, West Sussex, 195-222.

Ehrenstein C, Shu P, Wickenheiser E, Hirner A, Dolfen M, Emons H, Obe G (2002) Methyl mercury uptake and associations with the induction of chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Chemico-Biological Interactions* (141) 259-274.

Eitschberger , Mosel F, Hippler J, Sulkowski M, Hirner A, Rettenmeier A (in Vorbereitung) Titel noch nicht festgelegt.

Elschenbroich C (2008) *Organometallchemie*. Teubner Verlag, Wiesbaden, 15.

Emmerling O (1896) Zur Frage, wodurch die Giftigkeit arsenhaltiger Tapeten bewirkt wird. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* (29) 2728.

EPAR (2007) TRISENOX. *Europäischer öffentlicher Beurteilungsbericht (EPAR) (EMA/H/C/388)*.

Feldmann J (1995) *Erfassung flüchtiger Metall- und Metalloidverbindungen in der Umwelt mittels GC/ICP-MS*. Dissertation, Institut für Umweltanalytik und Angewandte Geochemie, Essen.

Feldmann J, Grümping R, Hirner A (1994) Determination of volatile metal and metalloid compounds in gases from domestic waste deposits with GC/ICP-MS. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* (350) 171-181.

Feldmann J, Hirner A (1995) Occurrence of volatile metal and metalloid Species in Landfill and Sewage Gases. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* (60) 339-359.

Fent K (1996) Organotin compounds in municipal wastewater and sewage sludge: contamination, fate in treatment process and ecotoxicological consequences. *The Science of the Total Environment* 151-159.

Fillol C, Dor F, Labat L, Boltz P, Le Bouard J, Mantey K, Mannschott C, Puskarczyk E, Viller F, Momas I, Seta N (2010) Urinary arsenic concentrations and speciation in residents living in an area with naturally contaminated soils. *Science of the Total Environment* (5) 1190-1194.

Fischer R, Rapsomanikis S, Andreae M, Baldi F (1995) Bioaccumulation of methylmercury and transformation of inorganic mercury by macrofungi. *Environmental Science & Technology* (26) 993-999.

Food Standards Agency of the UK (2004) Seaweed warning. *Food Survey Information Sheet (R938 - 28)*.

Forth W, Henschler D, Rummel W (2009) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Elsevier, München.

Fowler B, Goering P (1991) Antimony. In: Merian E. *Metals and Their Compounds in the Environment*, VCH, Weinheim, 743-750.

Francesconi K (2010) Arsenic species in seafood: Origin and human health implications. *Pure and Applied Chemistry* (82) 373-381.

Fuhrmann G (2006) *Toxikologie für Naturwissenschaftler*. Teubner Verlag, Wiesbaden.

Garbarino J, Bednar A, Rutherford D, Beyer R, Wershaw R (2003) Environmental Fate of Roxarsone in Poultry Litter. Part I. Degradation of Roxarsone during Composting. *Environmental Science & Technology* (8) 1509-1514.

Garje S, Jain V (1999) The chemistry of organo-arsenic, antimony and bismuth compounds: An Overview. *Main Group Metal Chemistry* (22) 45-58.

Michalke K, Meyer J, Hensel R (2007) Methylation of metal(loid)s by methanoarchaea: Production of volatile derivatives with high ecotoxicological impact and health concern. In: Garrett R, Klenk H. *Archaea - Physiology, Molecular Biology and Evolution*, Blackwell, Malden, 285-293.

Gilman H, Yale H (1942) Organobismuth Compounds. *Chemical Reviews* (30) 281-320.

Goates G, Green M, Powell P, Wade K (1972) *Einführung in die metallorganische Chemie*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

Gong Z, Lu X, Cullen W, Le C (2001) Unstable trivalent arsenic metabolites, monomethylarsonous acid and dimethylarsinous acid. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (16) 1409-1413.

Gosio B (1892) Action of Microphytes on Solid Compounds of Arsenic: A Recapitulation, by Dr. B. Gosio. (19) 104-106.

Gosio B (1897) Zur Frage, wodurch die Giftigkeit arsenhaltiger Tapeten bedingt wird. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* (30) 1024-1026.

Greenwood N, Earnshaw A (1990) *Chemie der Elemente*. VCH, Weinheim.

Grüter U, Hitzke M, Kresimon J, Hirner A (2001) Derivatisation of organo-metal(loid) species by sodium borohydride. Problems and solutions. *Journal of Chromatography A* (938) 225-236.

Haas K, Feldmann J (2000) Sampling of Trace Volatile Metal(oid) Compounds in Ambient Air using Polymer Bags: A Convenient Method. *Analytical Chemistry* (72) 4205-4211.

Hammer G, Lübcke T, Kettner R, Davis R, Recknagel H, Commichau A, Neumann H, Paczynska-Lahme B (2011) Natural Gas. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, 1-53.

Hansen C, Tsirigotaki A, Bak S, Pergantis S, Stürup S, Gammelgaard B, Hansen H (2010) Elevated antimony concentrations in commercial juices. *Journal of Environmental Monitoring* (12) 822-824.

Harris H, Pickering I, George G (2003) The Chemical Form of Mercury in Fish. *Science* (301) 1203.

Hayakawa T, Kobayashi Y, Cui X, Hirano S (2005) A new metabolic pathway of arsenite: arsenic–glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Archives of Toxicology* (79) 183-191.

Hill S, Fisher A, Liezers M (2006) Plasma Generation, Ion Sampling and Focusing. In: Nelms S. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*, Wiley-Blackwell, Oxford.

Hindersmann I, Hippler J, Hirner A, Mansfeld T (in Vorbereitung) Determination of the mercury species evaporation from floodplain soils under controlled water contents of the river Elbe by column experiments.

Hippler J (2011) *Weiterentwicklung einer HPLC-Methode zur Detektion von intrazellulären Arsenspezies*. Diplomarbeit, Essen.

Hippler J, Hollmann M, Hirner A (in Vorbereitung) Identification of methylated bismuth species in human blood samples confirmed by synthesis and stability survey of methyl bismuth cysteine.

Hippler J, Hollmann M, Juerling H, Hirner A (2009a) Synthesis and isolation of methyl bismuth cysteine and definitive identification by high resolution mass spectrometry. *Chemical Papers* (63) 742-744.

Hippler J, Hoppe H, Mosel F, Rettenmeier A, Hirner A (2009b) Comparative determination of methylmercury in whole blood samples using GC-ICP-MS and GC-MS techniques. *Journal of Chromatography B* (877) 2465-2470.

Hippler J, Kresimon J, Hirner A (2004) Volatile mercury species in environmental gases and biological samples. In: Hirner A, Emons H. *Organic Metal and Metalloid Species in the Environment Analysis*, Springer, Berlin, 113-136.

Hippler J, Zdrenka R, Reichel A, Weber D, Rozynek P, Johnen G, Dopp E, Hirner A (2011) Intracellular, time-resolved speciation and quantification of arsenic compounds in human urothelial and hepatoma cells. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (12) 2396-2403.

Hirner A (2006) Speciation of alkylated metals and metalloids in the environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (385) 555-567.

Hirner A, Feldmann J, Goguel R, Rapsomanikis S, Fischer R, Meinrat O (1994) Volatile Metal and Metalloid Species in Gases from Municipal Waste Deposits. *Applied Organometallic Chemistry* (8) 65-69.

Hirner A, Hippler J (2011) Trace Metal(loid)s (As, Cd, Cu, Hg, Pb, PGE, Sb, and Zn) and their Species. In: Wilderer P. *Treatise on Water Science* (3), Elsevier Academic Press, Oxford, Bd. 3, 31-57.

Hirner A, Rehage H, Sulkowski M (2000) *Umweltgeochemie*. Steinkopf, Darmstadt.

Hollmann M, Boertz J, Dopp E, Hippler J, Hirner A (2010) Parallel on-line detection of a methylbismuth species by hyphenated GC/EI-MS/ICP-MS technique as evidence for bismuth methylation by human hepatic cells. *Metallomics* (2) 52-56.

Housecroft C, Sharpe A (2006) *Anorganische Chemie*. Pearson, München.

Ilgen G, Huang J (2010) A new device of an automatic cryotrapping and cryofocussing system for the parallel ICP-MS and EI-MS detection of volatile metal and metalloid compounds in gaseous samples. *26th Annual Conference of the Society of Minerals and Trace Elements (GMS) (Leipzig)* Vortrag.

Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (2010) Permobil – Ein kompaktes Gerät zur Permeationsmessung. *Informationsblatt (IFA) (0304)* 2.

Institut für Stadtökologie und Bodenschutz (2011) Ergebniskarte geogen/pedogenes Anreicherungsgebiet. *Kreis Recklinghausen*.

Jenkins R, Craig P, Miller P, Stoop L, Ostah N, Morris T (1998) Antimony Biomethylation by Mixed Cultures of Micro-organisms under Aerobic Conditions. *Applied Organometallic Chemistry* (12) 449-455.

Johnen G, Rozynek P, von der Gathen Y, Bryk O, Zdrenka R, Johannes C, Weber D, Okuefuna O, Raiko I, Hippler J, Brüning T, Dopp E (eingereicht) Cross-contamination of a UROtsa cell line with T24 cells – molecular comparison of different cell lines. *PLoS ONE*.

Kohlmeyer U, Kuballa J, Jantzen E (2002) Simultaneous separation of 17 inorganic and organic arsenic compounds in marine biota by means of high-performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (16) 965-974.

Kösters J, Hippler J, Diaz-Bone R, Hirner A (2005) Parallel ICP-MS and EI-MS detection after GC separation as a unique tool for simultaneous identification and quantification of volatile heteroatomic organic compounds. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (20) 996-999.

Krabbenhoft D, Hurley J, Aiken G, Gilmour C, Marvin-DiPasquale M, Orem W, Harris R (2000) Mercury cycling in the Florida Everglades: a mechanistic field study. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* (27) 1-4.

Kranert M (2001) *Umverteilung von Schwermetallen in der Umwelt durch Komposte im Vergleich zu anderen Einträgen auf Böden*. EdDE-Dokumentation, Köln, Bd. 2.

Kreis Recklinghausen (2011) Ergebnisse der Probennahme am 24.08.2011. *Untersuchungsbericht, Geogenes Arsenvorkommen im Einzugsbereich des Dattelner Mühlenbaches*.

Kreisverwaltung Recklinghausen (2011) Geogenes Arsen - Bürgerinfo (3).

Kresimon J (2002) Untersuchung humaner Körperflüssigkeiten und Ausscheidungsprodukte auf metall- und metalloorganische Verbindungen mittels HG/LT-GC/ICP-MS. *Inauguraldissertation* Universität Essen.

Krüger K, Pepges H, Hippler J, Hartmann L, Hirner A, Straub H, Binding N, Mußhoff U (2007) Effects of dimethylarsinic and dimethylarsinous acid on evoked synaptic potentials in hippocampal slices of young and adult rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* (225) 40-46.

Krüger K, Straub H, Hirner A, Hippler J, Binding N, Musshoff U (2009) Effects of monomethylarsonic and monomethylarsonous acid on evoked synaptic potentials in hippocampal slices of adult and young rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* (236) 115-123.

Krupp E, Milne B, Mestrot A, Meharg A, Feldmann J (2008) Investigation into mercury bound to biothiols: structural identification using ESI-ion-trap MS and introduction of a method for their HPLC separation with simultaneous detection by ICP-MS and ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (390) 1753-1764.

Kuehnelt D, Goessler W (2003) Organoarsenic Compounds in the Terrestrial Environment. In: Craig P. *Organometallic Compounds in the Environment*, Wiley, West Sussex, 223-275.

Kühnel W (1989) *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*. Thieme, Stuttgart.

- Kunze U, Schwedt G (2009) *Grundlagen der quantitativen Analyse*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Landeswirtschaftskammer NRW (2011) Gärprodukt, Biogasanlage B. *Prüfbericht*.
- Latscha H, Klein H (2007) *Anorganische Chemie: Chemie-Basiswissen I*. Springer, Berlin, Bd. 1.
- Leermakers M, Baeyens W, De Gieter M, Smedts B, Meert C, De Bisschop H, Morabito R, Quevauviller P (2006) Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation. *Trends in Analytical Chemistry* (25) 1-10.
- Lewis R (1997) Researchers' Deaths Inspire Actions To Improve Safety. *The Scientist* (11) 1.
- Lohmann N (2006) *Analyse von Butylzinnverbindungen in Sedimenten mittels GC-AED. Dissertation*. Dissertation-Universität Hamburg, Hamburg.
- Maestre S, Mora J, Todolí J, Canals A (1999) Evaluation of several commercially available spray chambers for use in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (14) 61-67.
- Mäkelä E, Vainiotalo S, Peltonen K (2003) Permeation of 70% Isopropyl Alcohol Through Surgical Gloves: Comparison of the Standard Methods ASTM F739 and EN 374. *The Annals of Occupational Hygiene* (47) 305-312.
- Marsh J (1837) Beschreibung eines neuen Verfahrens, um kleine Quantitäten Arsenik von den Substanzen abzuscheiden, womit er gemischt ist. *Annalen der Chemie und Pharmacie* (23) 207-216.
- May T, Wiedmeyer R (1998) A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. *Atomic Spectroscopy* (19).
- Meyer J (2002) *Diplomarbeit*. Universität Essen.
- Meyer V (2004) *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie: Flüssigchromatographie*. Wiley-VCH, Weinheim.

Michalke K, Meyer J, Hirner A, Hensel R (2002) Biomethylation of bismuth by the methanogen *Methanobacterium formicicum*. *Applied Organometallic Chemistry* (16) 221-227.

Momplaisir G, Rosal C, Heithmar E (2001) Arsenic speciation methods for studying the environmental fate of organoarsenic animal feed additives. *U.S. EPA, NERL-Las Vegas*.

Mukherjee A, Sengupta M, Hossain M, Ahamed S, Das B, Nayak B, Lodh D, Rahman M, Chakraborti D (2006) Arsenic Contamination in Groundwater: A Global Perspective with Emphasis on the Asian Scenario. *Journal of Health, Population and Nutrition* (24) 142-163.

Nam S, Cheng J, Mindak W, Capar S (2006) Preliminary Results of Extraction, Separation and Quantitation of Arsenic Species in Food and Dietary Supplements by HPLC-ICP-MS. *Bulletin of the Korean Chemical Society* (27) 903-908.

Naranmandura H, Suzuki N, Suzuki K (2006) Trivalent arsenicals are bound to proteins during reductive methylation. *Chemical Research in Toxicology* (19) 1010-1018.

Ng J, Wang J, Shraim A (2003) A global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere* (52) 1353-1359.

Nierenberg D, Nordgren R, Chang M, Siegler M, Blayney M, Hochberg F, Toribara T, Cernichiari E, Clarkson T (1998) Delayed cerebellar disease and death after accidental exposure to dimethylmercury. *The New England Journal of Medicine* (338) 1672-1676.

North Safety Products (2001) *SilverShield/H4 Chemical Protection Guide*.

Ökotest (Oktober 2008) Energiesparlampen.

Packham C (2006) Gloves as Chemical Protection—Can They Really Work. *The Annals of Occupational Hygiene* (50) 545-548.

Pacyna E, Pacyna J, Sundseth K, Munthe J, Kindbom K, Wilson S, Steenhuisen F, Maxon P (2010) Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. *Atmospheric Environment* (44) 2487–2499.

Palmieri Y (1993) Bismuth: The amazingly “green” environmentally minded Element. *Bulletin Bismuth Institute (Special Issue)*.

Petzoldt J, Leigh I, Duffy P, Sexton C, Masters J (1995) Immortalisation of human urothelial cells. *Urological Research* (23) 377-380.

Polanz O, Paszkiewicz P (2003) Praxisnahe Auswahl von Chemikalien-Schutzhandschuhen - ein neuer Ansatz. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* (63) 410-412.

Pongratz R, Heumann K (1998) Production of Methylated Mercury and Lead by Polar Macroalgae - a Significant Natural Source for Atmospheric Heavy Metals in Clean Room Compartments. *Chemosphere* (36) 1935-1946.

Raabe M, Diaz-Bone R, Denecke M, Hirner A, Widmann R (2005) Metall(oid)organische Verbindungen in Kompostwerken. *Müllmagazin* (1) 3.

Raabe M, Hirner A, Widmann R (2006) *The occurrence and synthesis of methylated arsenic compounds during biological waste treatment - potential sources of pollution?*. ORBIT, Weimar.

Reichel R (2009) *Analyse von Arsenspezies mittels HPLC-ICP/MS*. Diplomarbeit, Essen.

Rettenmeier A, Hirner A, Dopp E, Hippler J (in Vorbereitung) Concentrations and toxicological evaluation of organometal(loid)s in the environment.

Riedel E (2004) *Anorganische Chemie*. de Gruyter, Berlin.

Rohr O (2002) Bismuth - the new ecologically green metal for modern lubricating engineering. *Industrial Lubrication and Tribology* (54) 153-164.

- Saha M (1920) Ionization in the Solar Chromosphere. *Philosophical Magazine Series 6* (40) 472-488.
- Schäfer E (1861) Die Arsenikesser in Steiermark. *Journal für Praktische Chemie* 101-110.
- Schmitz S (2007) *Der Experimentator: Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Schwedt G (2008) *Analytische Chemie*. Wiley, Weinheim.
- Seyferth D (2001) Cadet's Fuming Arsenical Liquid and the Cacodyl Compounds of Bunsen. *Organometallics* (20) 1488–1498.
- Shayesteh A, Shanshan Y, Bernath P (2005) Gaseous HgH_2 , CdH_2 , and ZnH_2 . *Chemistry - A European Journal* (11) 4709-4712.
- Shimoda Y, Suzuki Y, Endo Y, Kato K, Tachikawa M, Endo G, Yamanaka K (2010) Speciation Analysis of Arsenics in Commercial Hijiki by High Performance Liquid Chromatography-tandem-mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography-inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Journal of Health Science* (56) 47-56.
- Smedley P, Kinniburgh D (2002) A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* (17) 517–568.
- Snell J, Frech W, Thomassen Y (1996) Performance improvements in the determination of mercury species in natural gas condensate using an on-line amalgamation trap or solid-phase micro-extraction with capillary gas chromatography-microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. *Analyst* (121) 1055-1060.
- Sollmann T, Seifert J (1939) The Pharmacology of Trimethyl Bismuth. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (67) 17-49.
- Stauffer D (2008) Das Chromatogramm. In: Kromidas S, Kuss H. *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten*, Wiley-VCH, Weinheim, 3-53.

- Sturgeon R, Mester Z (2002) Analytical Applications of Volatile Metal Derivatives. *Applied Spectroscopy* (56) 202A-213A.
- Styblo M, Del Razo L, LeCluyse E, Hamilton G, Wang C, Cullen W, Thomas D (1999) Metabolism of Arsenic in Primary Cultures of Human and Rat Hepatocytes. *Chemical Research in Toxicology* (12) 560-565.
- Styblo M, Serves S, Cullen W, Thomas D (1997) Comparative Inhibition of Yeast Glutathione Reductase by Arsenicals and Arsenothiols. *Chemical Research in Toxicology* (10) 27-33.
- Styblo M, Thomas D (1997) Binding of arsenicals to proteins in an in vitro methylation system. *Toxicology and Applied Pharmacology* (147) 1-8.
- Sun H, Zhang L, Szeto K (2004) *Metal Ions in Biological Systems*. Bd. 41.
- Suzuki K, Iwata K, Naranmandura H, Suzuki N (2007) Metabolic differences between two dimethylthioarsenicals in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* (218) 166-173.
- Szpunar J, Bouyssiére B, Lobinski R (2004) Advances in analytical methods for speciation of trace elements in the environment. In: Emons H, Hirner A. *Organic Metal and Metalloid Species in the Environment Analysis, Distribution, Processes and Toxicological Evaluation*, Springer, Berlin, 17-40.
- Templeton D, Ariese F, Cornelius R, Danielsson L, Muntau H, van Leeuwen H, Lobinski R (2000) IUPAC Guidelines for Terms Related to Speciation of Trace Elements. *Pure and Applied Chemistry* (72) 1453-1470.
- Thomas R (2001 a) A Beginner's Guide to ICP-MS / Part II: The Sample-Introduction System. *Spectroscopy* (16) 56-60.
- Thomas R (2001 b) A Beginner's Guide to ICP-MS / Part III: The Plasma Source. *Spectroscopy* (16) 26-30.
- Thomas R (2001 c) A Beginner's Guide to ICP-MS / Part IV: The Interface Region. *Spectroscopy* (16) 26-29.

Thomas R (2001 d) Beginner's Guide to ICP-MS / Part VI — The Mass Analyzer. *Spectroscopy* (16).

Thomas R (2002) A Beginner's Guide to ICP-MS / Part X - Detectors. *Spectroscopy* (17) 34-39.

Todorov T, Ejnik J, Mullick F, Centeno J (2005) Arsenic Speciation in Urine and Blood Reference Materials. *Microchimica Acta* (151) 263–268.

U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, Directorate of Science, Technology and Medicine (1991) Dimethylmercury. *Hazard Information Bulletin* (February, 15).

Uhlenhut P, Gross ?, Bickel ? (1907) Untersuchungen über die Wirkung des Atoxyls auf Trypanosomen und Spirochäten. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* (4) 17. ?: Vornamen der Co-Autoren in der Originalliteratur nicht angegeben / nicht bekannt.

Ullrich S, Tanton T, Abdrashitova S (2001) Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (31) 241-293.

Umweltbundesamt (2011) Energiesparlampen: Bei Bruch ist Lüften das A&O. *Presse-Information* 039/2011.

Universität Freiburg (2012) Persönliche Schutzausrüstung: Handschuhe (Handschuhmerkblatt). *Abteilung Arbeitssicherheit / Universität Freiburg* (http://aci.anorg.chemie.tu-muenchen.de/new/images/stories/information/docs/unifreiburg_handschuhmerkblatt.pdf) 02.02.2012.

University of Illinois (2002) Most Residential Uses of CCA Wood to Be Replaced. *The Illinois Pesticide Review* (14) 1-8.

US EPA Method 7473 (2007) Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation and atomic absorption spectrometry.

von Recklinghausen U, Hartmann L, Rabieh S, Hippler J, Hirner A, Rettenmeier A, Dopp E (2008) Methylated Bismuth, but Not Bismuth Citrate or Bismuth Glutathione, Induces Cyto- and Genotoxic Effects in Human Cells in Vitro. *Chemical Research in Toxicology* (21) 1219-1228.

Walch S, Düster L, Schaumann E (2009) Kritische Anmerkungen zum EU-weiten Verbot von Glühlampen in Bezug auf Quecksilber. *Unterricht Physik* (111/112) 78-79.

Walter I, Schwerdtle T, Thuy C, Parsons J, Dianov G, Hartwig A (2007) Impact of arsenite and its methylated metabolites on PARP-1 activity, PARP-1 gene expression and poly(ADP-ribosylation) in cultured human cells. *DNA Repair* (6) 61-70.

WHO (2001). *Arsenic compounds, Environmental health criteria 224, 2nd ed.,*. Geneva: (World health organization).

Wiberg E, Henle W, Bauer R (1951) *Zeitschrift für Naturforschung* (6b) 393.

Wiberg E, Wiberg N, Holleman A (2001) *Inorganic Chemistry*. Academic Press, De Gruyter, San Diego, Berlin, New York.

Woggon H, Klein S (1983) Fortschrittsbericht Methylierungsreaktionen bei Spurenelementen. *Die Nahrung* (27) 21-29.

Wolfe-Simon F, Davies P, Anbar A (2009) Did nature also choose Arsenic?. *International Journal of Astrobiology* (8) 69-74.

Wolfe-Simon F, Switzer Blum J, Kulp T, Gordon G, Hoeft S, Pett-Ridge J, Stolz J, Webb S, Weber P, Davies P, Anbar A, Oremland R (2010) A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus. *Science* (Published Online 2 December 2010) DOI: 10.1126/science.1197258 .

Yan H, Wang N, Weinfeld M, Cullen W, Le X (2009) Identification of Arsenic-Binding Proteins in Human Cells by Affinity Chromatography and Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* (81) 4144-4152.

Zdrenka R (in Vorbereitung (2012)) *Dissertation: Early molecular changes in arsenic exposed human urothelial cells depending on cellular uptake and biotransformation*. Essen.

Zdrenka R, Dopp E, Hippler J, Braescher M, Hirner A, Weber D, Johnen G (2010) Early molecular changes in the genome of arsenic-exposed human urothelial cells depending on cellular uptake and biotransformation. In: Bundschuh J, Bhattacharya P. *Arsenic in Geosphere and Human Diseases*, Taylor & Francis, London, 324-325.

Zdrenka R, Hippler J, Hirner A, Dopp E (2012) Intracellular arsenic speciation and quantification in human urothelial and hepatic cells. In: Canda A. *Bladder Cancer - From Basic Science to Robotic Surgery*, InTech, 24.

Danksagung

„Mach fertig Jörg“ waren die Worte, die Lars mir als Widmung in seine Dissertation geschrieben hat. Nun kann ich sagen: „Habe fertig; Danke Lars“ und kann dies zum Anlass nehmen mich auch bei allen anderen zu bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen:

Als Erstes danke ich meinem Doktorvater Herrn Professor A.V. Hirner für sein überaus großes Vertrauen sowie seiner unendliche Geduld, die er mir bis zum Entstehen dieser Arbeit entgegengebracht hat und es mir so ermöglichte, diese Dissertation in seinem Institut durchzuführen. Danke auch für die fachliche Unterstützung und nicht zuletzt auch privaten Gespräche, durch die er zu einem wertvollen und freundschaftlichen Wegbegleiter wurde.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. E. Dopp, die mir viele wertvolle Hinweise gegeben hat und bereit war, meine Arbeit als Zweitgutachterin zu betreuen. Danke auch für die gute Zusammenarbeit und die Möglichkeit meine Arbeiten bis in Ihre Arbeitsgruppe am Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin auszuweiten. Mein Dankeschön daher auch an den Leiter dieser Einrichtung, Herrn Prof. A.W. Rettenmeier, all die Mitarbeiter und besonders an R. Zdrenka und G. Zimmer für die freundliche Unterstützung bei der Kultivierung und Exposition der Zellen.

Danken möchte ich natürlich auch den Mitarbeitern des Institutes für Umweltanalytik, besonders Maria, die immer ein wachsames Auge auf die ICP/MS gehalten hat und Birgit, die für die moralische Unterstützung gesorgt hat.

Ganz besonders danke ich auch Ricarda, Georg und allen anderen Mitarbeitern des DFG-Projektes, innerhalb dessen Teile dieser Arbeit durchgeführt wurden, für die stundenlangen Diskussionen und vielen Ideen, die letztendlich mit in diese Arbeit eingeflossen sind. Danke auch an Markus und Maxim, denen ich mit vielen Fragen auf die Nerven gegangen bin.

Vielen Dank natürlich auch an Herrn A. Barrenstein für die Unterstützung im Bereich der Biogasanlagen.

An alle, die diese Arbeit gelesen und mir bei den Korrekturen geholfen haben geht ebenfalls ein großes Dankeschön. Besonders an Gina, Markus und Marion, die bei der Suche nach Tippfehlern auch immer mit Verbesserungsvorschlägen und Formulierungshilfen zur Stelle waren.

Im Privaten gilt mein Dank meiner gesamten Familie, besonders Barbara und auch Fabian, der so viele Tage und vor allem Abende und auch Wochenenden auf seinen Papa verzichten musste! Ich weiß, dass ich meine Dissertation heute nicht in den Händen halten könnte, wenn es nicht so viele Menschen um mich herum gäbe, die mich immer unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten, auch wenn sie hier nicht einzeln aufgeführt werden.

Danke!

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Speziierung und Toxizität metall(oid)organischer Verbindungen ausgewählter Metall(oid)e in biologischen und umweltrelevanten Systemen“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Februar 2013

Lebenslauf

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten".

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten".

Publikationsliste

Die im Folgenden aufgelisteten Publikationen, Buchkapitel und Poster befinden sich als Sonderdrucke am Ende dieser Arbeit. Alle weiteren, eigenen Publikationen sind im Anschluss aufgelistet.

Buchkapitel - im Anhang

Zdrenka R, Hippler J, Hirner AV, Dopp E, Intracellular arsenic speciation and quantification in human urothelial and hepatic cells, In: Canda AE(Ed.) Bladder Cancer - From Basic Science to Robotic Surgery, Intech (2012).

Hirner AV, Hippler J, Trace Metal(loid)s (As, Cd, Cu, Hg, Pb, PGE, Sb, and Zn) and their Species. In: Wilderer P (Ed.) Treatise on Water Science (3), Elsevier Academic Press, Oxford (2011) 31–57.

Referierte Publikationen - im Anhang

Dopp E, von Recklinghausen U, Hippler J, Diaz-Bone RA, Richard J, Zimmermann U, Gerhards M, Rettenmeier AW, Hirner AV, Toxicity of volatile methylated species of Bismut, arsenic, tin and mercury in mammalian cells in vitro. Journal of Toxicology (Special Issue: Toxicity of Organometal(oids)) 2011 (Article ID 503576) 7 Seiten.

Hippler J, Zdrenka R, Reichel RAD, Weber DG, Rozynek P, Johnen G, Dopp E, Hirner AV, Intracellular, time resolved speciation and quantification of arsenic compounds in human urothelial and hepatoma cells. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 2011 (26) 2396-2403.

Poster - im Anhang

Zdrenka R, Hippler J, Johnen G, Hirner AV, Dopp E, Arsenic-induced malignant transformation of human urothelial cells. xCELLigence System Global User Conference, Rome, Italy, 3-4 Mai 2011.

Hippler J, Barrenstein A, Hirner AV, Schmitz OJ, Metall(oid)organische Verbindungen in Biogasanlagen. ANAKON, Essen, Germany, 4-7 März 2013.

Vorträge

Hippler J, Vorkommen flüchtiger Metallverbindungen bei der Kompostierung und der Verwertung von Abfällen in Biogasanlagen. Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (LANUV), Fachgespräch Feststoffuntersuchung 2012 (Trends und Tendenzen in der Abfall-, Boden- und Altlastenuntersuchung), Essen, 6. März 2012.

Weitere eigene Publikationen

Johnen G, Rozynek P, von der Gathen Y, Bryk O, Zdrenka R, Johannes C, Weber D, Okuefuna O, Raiko I, Hippler J, Brüning T, Dopp E, Cross-contamination of a UROtsa cell line with T24 cells – molecular comparison of different cell lines PLoS ONE (eingereicht 2013).

Baars T, Kleinbongard P, Böse D, Konorza T, Möhlenkamp S, Hippler J, Erbel R, Heusch, Saphenous vein aorto-coronary graft atherosclerosis in patients with chronic kidney disease: more plaque calcification and necrosis, but less vasoconstrictor potential. Basic Research in Cardiology 2012 (107) 303.

Zdrenka R, Dopp E, Hippler J, Braescher M, Hirner AV, Weber DG, Johnen G, Early molecular changes in the genome of arsenic-exposed human urothelial cells depending on cellular uptake and biotransformation. In: Jean J-S, Bundschuh J,

Bhattacharya P (Eds.) Arsenic in Geosphere and Human Diseases; As 2010, Taylor & Francis Group, London (2010) 324-325.

Hollmann M, Boertz J, Dopp E, Hippler J, Hirner AV, Parallel on-line Detection of a Methylbismuth Species by hyphenated GC/EI-MS/ICP-MS technique as evidence for Bismuth methylation by human hepatic cells.*) Metallomics 2010 (2) 52-56.

Hippler J, Hollmann M, Juerling H, Hirner AV, Synthesis and isolation of methyl bismuth cysteine and definitive identification by high resolution mass spectrometry. Chemical Papers 2009 (63) 742-744.

Hippler J, Hoppe HW, Mosel F, Rettenmeier AW, Hirner AV, Comparative determination of methylmercury in whole blood samples using GC-ICP-MS and GC-MS techniques. Journal of Chromatography B 2009 (877) 2465-2470.

Krüger K, Straub H, Hirner AV, Hippler J, Binding N, Musshoff U, Effects of monomethylarsonic and monomethylarsonous acid on evoked synaptic potentials in hippocampal slices of adult and young rats. Toxicology and Applied Pharmacology 2009 (236) 115-123.

Boertz J, Hartmann LM, Sulkowski M, Hippler J, Mosel F, Diaz-Bone RA, Michalke K, Rettenmeier AW, Hirner AV, Determination of trimethylbismuth in the human body following ingestion of colloidal bismuth subcitrate. Drug Metabolism and Disposition 2009 (37) 352-358.

Recklinghausen von U, Hartmann LM, Rabieh S, Hippler J, Hirner AV, Rettenmeier AW, Dopp E, Methylated bismuth, but not bismuth citrate or bismuth glutathione induces cyto- and genotoxic effects in human cells in vitro. Chemical Research in Toxicology 2008 (21) 1219-1228.

Quass U, John AC, Beyer M, Lindermann J, Kuhlbusch TAJ, Hirner AV, Sulkowski M, Sulkowski M, Hippler J, Ermittlung des Beitrages von Reifen-, Kupplungs-, Brems- und Fahrbahnabrieb an den PM10-Emissionen von Straßen. Wirtschafts-verlag N. W. Verlag für neue Wissenschaft / [Hrsg:] Bundesanstalt für Straßenwesen. 2008 (165) 1-58.

Krüger K, Repges H, Hippler J, Hartmann LM, Hirner AV, Straub H, Binding N, Mußhoff U, Effects of dimethylarsinic and dimethylarsinous acid on evoked synaptic potentials in hippocampal slices of young and adult rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007 (225) 40-46.

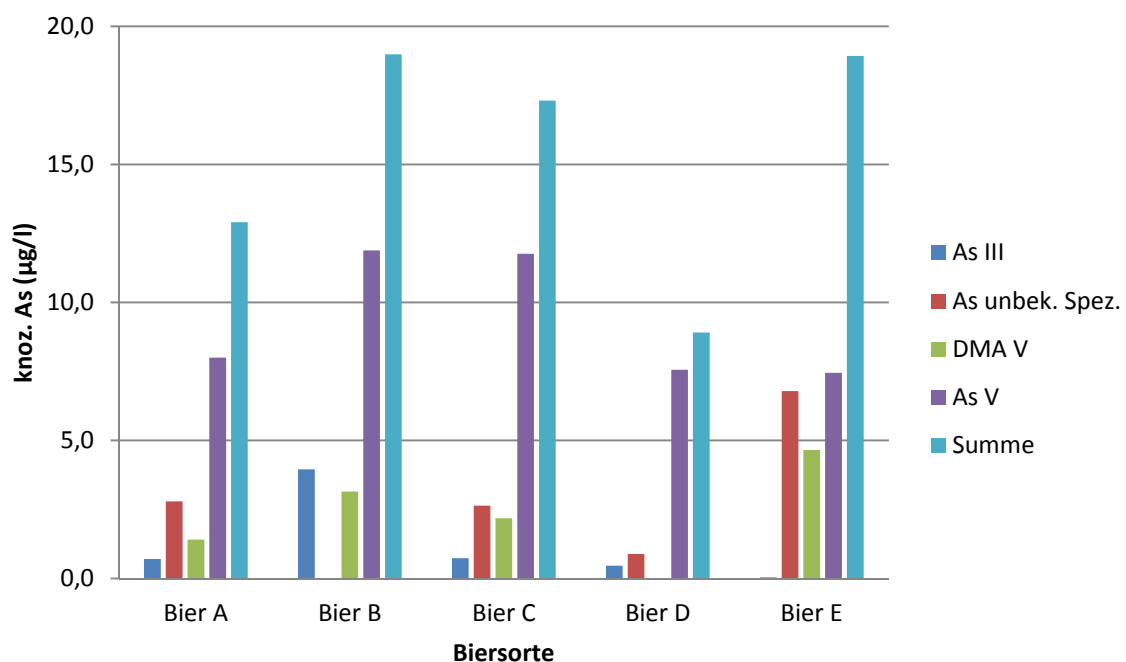
Kösters J, Hippler J, Diaz-Bone RA, Hirner AV, Parallel ICP-MS and EI-MS detection after GC separation as a unique tool for simultaneous identification and quantification of volatile heteroatomic organic compounds. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2005 (20) 996-999.

Hirner AV, Hartmann LM, Hippler J, Kresimon J, Koesters J, Michalke K, Sulkowski M, Rettenmeier AW, Organometal(loid) compounds associated with human metabolism. In: Hirner AV, Emons, H (Eds.) *Organic Metal and Metalloid Species in the Environment Analysis, Distribution, Processes and Toxicological Evaluation*, Springer, Berlin (2004) 181-204.

Hippler J, Kresimon J, Hirner AV, Volatile mercury species in environmental gases and biological samples. In: Hirner AV, Emons H (Eds.) *Organic Metal and Metalloid Species in the Environment Analysis, Distribution, Processes and Toxicological Evaluation*, Springer, Berlin (2004) 113-136.

Anhang - Arsenspezies im Bier

Die folgende Abbildung zeigt die mittels HPLC/ICP-MS bestimmte Arsenspeziesverteilung in verschiedenen deutschen Biersorten. In allen Sorten ist As(V) die dominierende Spezies. In vier der fünf Sorten ist neben As(III) und DMA(V) eine weitere, unbekannte Arsenspezies nachweisbar. Auffallend ist die sehr unterschiedliche Speziesverteilung.



Durch Aufsummierung der Spezies werden Arsenkonzentrationen im Bereich zwischen 9 und 19 µg/l ermittelt. Diese Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit den von Herce-Pagliai *et al.*²⁷. (Hydridgenerierung / IEC-HG-AAS) publizierten Konzentrationen von 2 bis 28 µg/l. Die ermittelten Arsenkonzentrationen liegen damit zum Teil über dem von der WHO empfohlenen Grenzwert im

²⁷ Herce-Pagliai C, Gonzalez G, Camean AM, Repetto M (1999) Presence and distribution of arsenical species in beers. Food Additives and Contaminants (16) 267-271.

Trinkwasser von 10 µg/l. Auch Huang *et al.*²⁸ haben kürzlich 23 Bierproben auf ihre Arsenspezies untersucht. Auch sie konnten bei einer Gesamtarsenkonzentration von 0,75 bis 13,4 µg/L Arsenat als Hauptspezies im Bier ausmachen. Methylierte Komponenten spielten, wie bei den hier durchgeführten Messungen, nur eine untergeordnete Rolle.

²⁸ Huang JH, Hu KN, Ilgen J, Ilgen G, Occurrence and stability of inorganic and organic arsenic species in wines, rice wines and beers from Central European market (2012) Food Additives & Contaminants: Part A. Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment (29) 85-93.

Anhang - Poster

xCELLigence System Global User Conference, Rome, Italy, May 3-4 2011



Arsenic-induced malignant transformation of human urothelial cells



Ricarda Zdrenka¹, Jörg Hippler², Georg Johnen³, Alfred V. Hirner², Elke Dopp¹

¹ University Hospital Essen, Institute of Hygiene and Occupational Medicine, 45122 Essen (ricarda.zdrenka@uni-due.de)

² University of Duisburg-Essen, Institute of Environmental Analytical Chemistry, 45141 Essen

³ Institute of the Ruhr-University Bochum, Institute for Prevention and Occupational Medicine of the German Social Accident Insurance, 44789 Bochum

Introduction

As defined by the WHO arsenic is currently characterised as the most harmful toxin in drinking-water worldwide. While temporary high doses of arsenic are applied in cancer therapy, chronic low-dose exposure may cause e.g.

bladder cancer. The trivalent compounds MMA(III) (monomethyl-arsinous acid) and DMA(III) (dimethyl-arsinous acid) are considered the most cyto- and genotoxic arsenic species.

In our study we analysed cytotoxic and genotoxic effects as well as the malignant transformation of UROtsa cells (urothelial cells) after chronic exposure to MMA(III) *in vitro*.

Toxicity

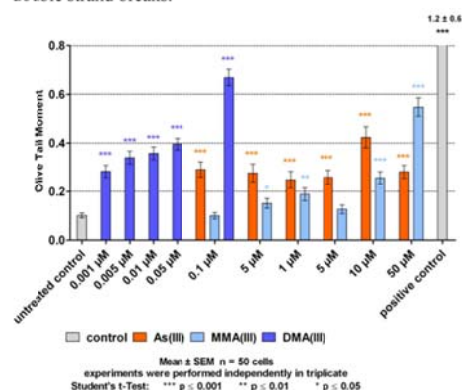
The Trypan Blue Assay was used for measuring the cytotoxic activity of the arsenic compounds listed in Tab. 1. The trivalent arsenicals exhibited higher toxicity compared to the pentavalent species.

▼ Tab. 1:

LC₅₀ – values measured by Trypan Blue Assay [μM] after 1 h of exposure.

	As (III)	MMA (III)	DMA (III)	As (V)	MMA (V)	DMA (V)	TMAO
UROtsa	> 5000	83	15	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000

The genotoxicity of inorganic As(III), MMA(III) and DMA(III) in UROtsa cells was assessed by the Alkaline Comet Assay which detects single strand breaks as well as double strand breaks.

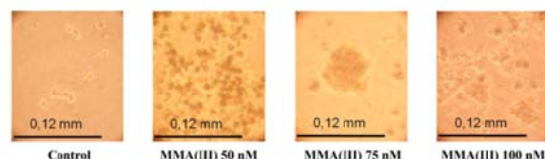


▲ Fig. 1:

Statistical survey of concentration series with As(III), MMA(III) and DMA(III) in UROtsa cells demonstrates increasing genotoxicity already after 30 min of exposure.

Phenotypical alteration

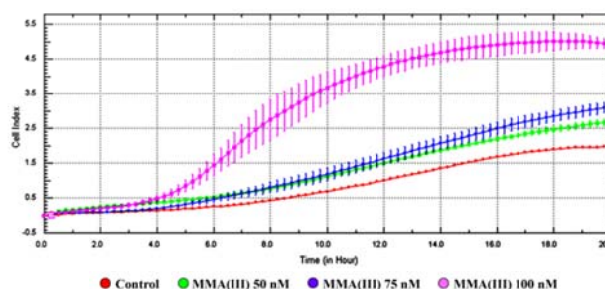
The loss of an anchorage dependent growth is a strong indication for malignant transformation. The Colony Formation Assay in Soft Agar was determined to analyse the anchorage independent growth.



▲ Fig. 2:

Colony Formation Assay of UROtsa cells after 58 weeks of exposure to MMA(III).

The ability of invasion is for malignant transformed cells an essential condition for metastasis. This includes on the one hand the property of migration and the penetration of biological surfaces and, on the other hand, the ability to adhere and grow at a different location.



▲ Fig. 3:

The Invasion Assay of UROtsa cells after 92 weeks of exposure to MMA(III). The Assay was performed using the xCELLigence DP system with collagen coated CIM-Plates.

Summary and Conclusion

In summary, MMA(III) exhibits significant genotoxic effects in UROtsa cells already after 30 min of exposure. After chronic exposure to MMA(III) UROtsa cells show both anchorage independent growth as well as invasion properties.

We conclude from our study that MMA(III) rapidly induces genotoxic effects and causes malignant transformation in UROtsa cells after chronic exposure *in vitro*. This might indicate a property of arsenic-induced bladder carcinogenicity including metastasis.

This work was kindly funded by the German research Foundation (DFG) Grant No: Do 332/8 and Hi 276/16-1

Metall(oid)organische Verbindungen in Biogasanlagen

Joerg Hippler¹, Axel Barrenstein², Alfred V. Hirner³ und Oliver J. Schmitz¹

¹Angewandte Analytische Chemie, Universität Duisburg-Essen, Universitätsstr. 5-7, 45141 Essen

²Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW, Dienststelle Düsseldorf, Auf dem Draup 25, 40221 Düsseldorf

³Institut für Umweltanalytik, Universität Duisburg-Essen, Universitätsstr. 3-5, 45141 Essen

Einleitung

Biogas entsteht, wenn organisches Material wie Getreide, Ernterückstände, tierische Exkremente, Nebenprodukte der Lebensmittelproduktion oder andere Biomasse unter Ausschluss von Licht und Sauerstoff durch Bakterien abgebaut wird. Biogasanlagen bieten aufgrund ihrer biologischen Aktivität, den vorherrschenden Temperaturen und den eingesetzten Stoffen aber auch optimale Voraussetzungen zur Bildung methylierter, metall(oid)organischer Verbindungen, wie sie bereits in Kläranlagen, Mülldeponien oder im Kompost nachgewiesen werden konnten. Inwieweit auch Biogasanlagen dazu beitragen, welche Spezies gebildet werden und wie sich diese auf die einzelnen Phasen (Biogas, Gaskondensat, Gärsubstanzen) verteilen, ist bisher nicht untersucht. Für ein erstes Screening wurden daher vier Biogasanlagen mittels HG-GC-ICP/MS bzw. HPLC-ICP/MS auf leichtflüchtige, methylierte metall(oid)organische Verbindungen im Biogas, Anmaischbecken, Nachgärer und Gaskondensat untersucht.

Probenahme und Methoden

Zum Screening der Metall(oid)spezies wurden in vier Biogasanlagen Proben des Biogases, der Anmaischbecken (Abbildung 1), der Nachgärer sowie Proben des Gaskondensates entnommen (Abbildung 2). Zur Analyse der Biogasproben wurden je 4 Liter des Gasvolumens aus den 10 Liter Gasbeutel (Teflon-Bag®) auf eine mit Supelcoport (10% SP-2100 on Supelco, Bellefonte, USA) gepackte und gekühlte Säule (-120°C) aufgegeben. Zur Abtrennung der Matrix (Wasser, CO₂) wurde die Säule ausgeheizt und die Metall(oid)spezies in den gekühlten (-80°C) Injektor (LUNA 2100, Joint Analytical Systems, Mönch) eines Gaschromatographen (Agilent 5973, Agilent, Waldbronn) überführt. Die Trennung der leicht flüchtigen Metall(oid)spezies erfolgte auf einer 30m Kapillarsäule (Rtx-55i, Restek, GmbH, Bad Nörmberg). Zur Detektion der Metall(oid)spezies wurde der Gaschromatograph über eine Transferline an ein ICP-MS (Agilent 7500a, Agilent, Waldbronn) gekoppelt. Der apparative Aufbau ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Speziesbestimmung in den flüssigen Proben der Anmaischbecken, Nachgärer und Gaskondensate erfolgte nach Derivatisierung (Hydridgenerierung / HG) mittels Natriumborhydrid und anschließendem Ausstreifen (pumpen) und Überführen der volatilen Spezies in den gekühlten Injektor des Gaschromatographen (HG-GC-ICP/MS). Da die Hydrierung mit NaBH₄ nicht strikt zwischen penta- und trivalenten Arsen- und Antimon- und Arsen- und Antimon- unterscheidet, wurde für die Arsenspezies zusätzlich eine HPLC-ICP/MS-Analyse durchgeführt. Die Trennung der Arsenspezies erfolgte auf einer RP-Säule (Luna 3u C18(2), 150 x 4,6 mm, Phenomenex, Aschaffenburg) unter isokratischen Bedingungen, um den Einfluss des Laufmittels auf die Sensitivität des ICP/MS zu unterdrücken.



Ergebnisse

Anmaischbecken und Nachgärer

Sowohl in den Anmaischbecken, als auch in den Nachgärern traten in allen untersuchten Biogasanlagen methylierte Metall(oid)organische Verbindungen auf. Im Vergleich zu den Anmaischbecken waren in den Nachgärern sowohl geringere Konzentrationen, als auch veränderte Spezieszusammensetzungen zu beobachten. So konnten z.B. in den Proben der Anmaischbecken neben dem anorganischen Arsen (nach der Derivatisierung in Form von AsH₃) auch methylierte Arsen- (Mono-, Di- und Trimethylarsen) nachgewiesen werden. Anlage A fiel im Vergleich mit den anderen Anlagen durch eine wesentlich höhere Konzentration an anorganischem Arsen (IAs) auf. In dieser Anlage waren im Nachgärer, unabhängig von dem Metall(oid), kaum noch methylierte Spezies nachweisbar. Die quantifizierten Werte der einzelnen Arsen- und Antimon- Spezies im Anmaischbecken sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Während in den Proben aus den Anmaischbecken ein Großteil des anorganischen Arsens (nach der Derivatisierung in Form von AsH₃) als Quacksilber in monomethylierter Form vorlag, fanden sich in den Nachgärern fast ausschließlich Hg⁰ und Me₂Hg.

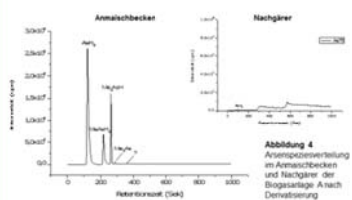


Tabelle 1: Arsenkonzentrationen in den Anmaischbecken der biotesteten Biogasanlagen in µg/kg Substrat (beutet)

As µg/kg	Anlage A	Anlage B	Anlage C	Anlage D
IAs	16	0.7	1.2	1.5
MeAs	6.8	0.2	2.8	0.8
Me ₂ As	13	0.1	0.3	0.1
Me ₃ As	0.6	0.3	0.7	0.2

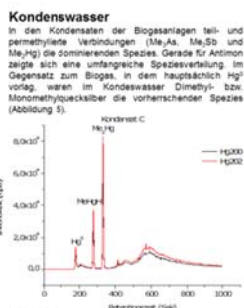


Abbildung 5: Quacksilber-Speziesanalyse im Biogasgaskondensat der Anlage C nach Derivatisierung. Neben der dominierenden Spezies Me₂Hg und sowohl Monomethyl- als auch elementares Hg nachweisbar.

Biogas

Im Biogas aller Anlagen konnten permethylierte metall(oid)organische Verbindungen nachgewiesen werden. Der Konzentrationsbereich der permethylierten Spezies lag, zusammenfassend für alle untersuchten Anlagen, zwischen 31-694 ng/m³ Me₂As, 0-2 ng/m³ Me₂Hg, 0-7000 ng/m³ Me₂Sn und 5-79 ng/m³ Me₂Sn. Die im Biogas ermittelten Werte sind mit denen im Klär- und Deponiegas durchaus vergleichbar (Abbildung 6). Auffallend sind die geringen Konzentrationen an Me₂Hg, diese liegen in anderen, vergleichbaren Gasen deutlich höher. Allerdings wurden im Biogas deutlich höhere Werte an Hg⁰ nachgewiesen (bis zu 519 ng/m³ in Anlage E).

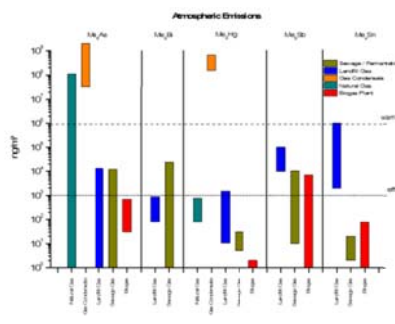


Abbildung 6: Vergleich der Emissionen permethylierter metall(oid)organischer Verbindungen aus natürlichen Gasen (Natural Gas), Deponiegas (Landfill Gas), Klärgas (Sewage Gas) und Gaskondensaten (Gas Condensate) im Vergleich mit Biogasanlagen. Vergleichswerte und Abbildung entnommen aus: Reitenmeier et al. (in Vorbereitung).

Zusammenfassung

- In allen Biogasanlagen konnten sowohl in den Anmaischbecken, den Nachgärern als auch in den Biogasen und Biogasgaskondensaten permethylierte metall(oid)organische Verbindungen nachgewiesen werden.
- Auffallend sind die geringen Konzentrationen an Me₂Hg im Biogas, dieses scheint im Gaskondensat abgeschieden zu werden.
- Eine Massenbilanz der Metall(oid)konzentrationen in den Biogasanlagen war nicht möglich, da weder das Volumen des abgeschiedenen Gaskondensates noch die Massen/Volumina der Anmaischbecken, Nachgärer oder das gebildete Biogasvolumen bekannt sind.
- Die im Biogas ermittelten Werte sind mit denen im Klär- und Deponiegas vergleichbar.

Kontakt:
Universität Duisburg-Essen
Fakultät für Chemie
Angewandte Analytische Chemie
Prof. Dr. Oliver J. Schmitz
Universitätsstr. 5-7, 45141 Essen
Email: oliver.schmitz@uni-due.de
www.uni-due.de/aac

Literatur

Hippler J. Vorkommen flüchtiger Metallverbindungen bei der Kompostierung und der Verwertung von Abfällen in Biogasanlagen. Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (LANUV), Bericht zum Fachgespräch Feststoffuntersuchung (Trends und Tendenzen in der Abfall-, Boden- und Altlastenuntersuchung). Essen, 2012.

Danksagung

Die Autoren danken dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW für die finanzielle Unterstützung, sowie den Betreibern der Biogasanlagen und den Ausstellern / Laboren des LANUV für die Bereitstellung der Proben.



Anhang - Sonderdrucke eigener Publikationen

"Die Sonderdrucke sind in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes und des Urheberrechtes nicht enthalten".

